

FACULTÉ DE MÉDECINE DE PARIS

ANNEE 1957

THÈSE

N° 803

POUR

LE DOCTORAT EN MÉDECINE

(DIPLOME D'ÉTAT)

PAR

Gérard PERRAULT

Élève de l'École du Service de Santé Militaire

Né le 6 juillet 1932, à Valenciennes (Nord)

Présentée et soutenue publiquement le 2 juillet 1957

Etude

**du devenir des leucocytes transfusés
après marquage par divers isotopes radioactifs**

Président : M. FAUVERT, Professeur

PARIS
IMPRIMERIE R. FOULON
29, RUE DEPARCIEUX, 29
1957

FACULTE DE MEDECINE DE PARIS

Nom du Candidat : PERRAULT

Prénom : GÉRARD

Date de soutenance : 2 juillet 1957

Numéro d'ordre :

(Ces deux mentions seront complétées par le Service de la Bibliothèque)

PERRAULT (GÉRARD) —
Etude du devenir des leuco-
cytes transfusés, après mar-
quage par divers isotopes ra-
dioactifs. — Paris, Imp. R.
Foulon, 1957, in-8°, 87 p.,
5 fig.

(Thèse Médec. (Etat), Paris,
1957, N°).

PERRAULT (GÉRARD) —
Etude du devenir des leuco-
cytes transfusés, après mar-
quage par divers isotopes ra-
dioactifs. — Paris, Imp. R.
Foulon, 1957, in-8°, 87 p.,
5 fig.

(Thèse Médec. (Etat), Paris,
1957, N°).

PERRAULT (GÉRARD) —
Etude du devenir des leuco-
cytes transfusés, après mar-
quage par divers isotopes ra-
dioactifs. — Paris, Imp. R.
Foulon, 1957, in-8°, 87 p.,
5 fig.

(Thèse Médec. (Etat), Paris,
1957, N°).

PERRAULT (GÉRARD) —
Etude du devenir des leuco-
cytes transfusés, après mar-
quage par divers isotopes ra-
dioactifs. — Paris, Imp. R.
Foulon, 1957, in-8°, 87 p.,
5 fig.

(Thèse Médec. (Etat), Paris,
1957, N°).

FACULTÉ DE MÉDECINE DE PARIS

ANNEE 1957

THÈSE

N°

POUR

LE DOCTORAT EN MÉDECINE

(DIPLOME D'ÉTAT)

PAR

Gérard PERRAULT

Élève de l'École du Service de Santé Militaire

Né le 6 juillet 1932, à Valenciennes (Nord)

Présentée et soutenue publiquement le 2 juillet 1957

Etude

du devenir des leucocytes transfusés
après marquage par divers isotopes radioactifs



Président : M. FAUVERT, Professeur

PARIS
IMPRIMERIE R. FOULON
29, RUE DEPARCIEUX, 29
1957

PROFESSEURS HONORAIRES :

MM. Bénard (H.), Brocq (P.), Bulliard (H.), Cadenat (F.), Carnot (P.), Chabrol (Et.), Champy (C.), Chevassu (M.), Debré (R.), Delbet (P.), Donzelot (E.), Gastinel (P.), Guillaïn (G.), Halphen (E.), Harvier (P.), Laroche (G.), Laubry (Ch.), Lemaitre (F.), Lévy-Solal (E.), Lhermitte (J.), Lian (C.), Loeper (M.), Marion (G.), Mathieu (P.), Mocquot (P.), Mondor (H.), Mulon (P.), Olivier (E.), Richet (Ch.), Sannié (Ch.), Sézary (A.), Tanon (L.), Velter (E.).

DOYEN Léon BINET
Membre de l'Institut

ASSESSEUR Jean VERNE

I. — PROFESSEURS

	MM.
Anatomie	DELARUE (A.)
Anatomie pathologique	FASQUELLE (R.)
Bactériologie	JAYLE (M.-F.)
Biochimie médicale	CORDIER (G.)
Biologie appliquée à l'Éducation physique et aux Sports	CHAILLEY-BERT (P.)
Biologie médicale	FAUVERT (R.)
Cancérologie médicale et sociale	BERNARD (J.)
Clinique de cardiologie	MOUQUIN (M.)
Cliniques chirurgicales	Beaujon SICARD (A.)
	Cochin QUÉNU (J.)
	Hôtel-Dieu MÈNÉGAUX (G.)
	Salpêtrière MOULONGUET (P.)
Clinique chirurgicale réparatrice et orthopédique	MERLE D'AUBIGNÉ (R.)
Clinique de chirurgie cardio-vasculaire	DE GAUDART-D'ALLAINES (F.)
Clinique de chirurgie infantile et orthopédie	FÈVRE (M.)
Clinique de chirurgie pleuro-pulmonaire	MONOD (R.)
Clinique gynécologique	FUNCK-BRENTANO (P.)
Clinique des maladies cutanées et syphilitiques	DEGOS (R.)
Clinique des maladies des enfants	CATHALA (J.)
Clinique des maladies infectieuses	MOLLARET (P.)
Clinique des maladies mentales et de l'encéphale	DELAY (J.)
Clinique des maladies métaboliques	HAMBURGER (J.)
Clinique des maladies du sang	CHEVALLIER (P.)
Clinique des maladies du système nerveux	ALAJOUANINE (T.)
Cliniques médicales	Bichat JUSTIN-BESANÇON (L.)
	Broussais DE GENNES (L.)
	Cochin MOREAU (R.)
	Hôtel-Dieu BARIÉTY (M.)
Clinique médicale d'hydro-climatologie thérapeutique	DEBRAY (C.)
Clinique médicale propédeutique	PASTEUR VALLERY-RADOT (L.)
Clinique médico-sociale du diabète sucré et des maladies de la nutrition	BOULIN (R.)
Clinique de neuro-chirurgie	PETIT-DUTAILLIS (D.)
Cliniques obstétricales	Baudelocque LACOMME (M.)
	Port-Royal VARANGOT (J.)
Clinique d'obstétrique et de gynécologie	LANTUÉJOL (P.)
Clinique ophtalmologique	RENARD (G.)
Clinique oto-rhino-laryngologique	AUBIN (A.)
Clinique de pneumo-phthisiologie	BERNARD (E.)
Clinique psychiatrique infantile	HEUYER (C.)
Clinique de puériculture	LELONG (M.)
Clinique rhumatologique médicale et sociale	COSTE (F.)
Clinique stomatologique	DECHAUME (M.)
Clinique thérapeutique chirurgicale	SÈNÈQUE (J.)
Clinique thérapeutique médicale	LEMAIRE (A.)

Clinique urologique	FEY (B.)
Embryologie	GIROUD (A.)
Génétique médicale	LAMY (M.)
Histoire de la médecine et de la chirurgie	SOULIÉ (P.)
Histologie	VERNE (J.)
Hygiène et clinique de la première enfance	TURPIN (R.)
Hygiène et médecine préventive	JOANNON (C.)
Médecine légale	PIÉDELIÈVRE (R.)
Médecine du Travail	DESOLLE (H.)
Parasitologie et histoire naturelle médicale	GALLIARD (H.)
Pathologie chirurgicale	COUVELAIRE (R.)
Pathologie exotique	LAVIER (G.)
Pathologie expérimentale et comparée	LENÈGRE (J.)
Pathologie humorale et immunologie expérimentale (chaire à titre personnel)	MERKLEN (F.)
Pathologie médicale	DECOURT (J.)
Pathologie et thérapeutique générales	GARCIN (J.)
Pédiatrie sociale	MARIE (J.)
Pharmacologie et matière médicale	HAZARD (R.)
Physico-chimie médicale (chaire à titre personnel)	DOGNON (A.)
Physiologie	BINET (L.)
Physique médicale	STROHL (A.)
Radiologie médicale	DESGREZ (H.)
Technique chirurgicale	PATEL (J.)
Thérapeutique	BROUËT (G.)

II. — PROFESSEURS SANS CHAIRE MAITRES DE CONFERENCES-AGREGES ET AGREGES

MM.		MM.	
Anatomie . . .	{ DELMAS (A.) <i>pr. s. ch.</i>	Neurologie . . .	LHERMITTE (F.)
	{ CABROL (C.)	Obstétrique . . .	{ GRASSET (J.)
	{ DEBEYRE (J.)		{ LE LORIER (G.)
	{ OLIVIER (G.)		{ LEPAGE (F.)
Anatomie pathologique . . .	{ GAUTHIER-VILLARS		{ MERGER (R.)
	{ (Mlle P.) <i>pr. s. ch.</i>	Ophtalmologie . . .	{ MORIN (P.)
	{ BUSSET (F.)		{ RAVINA (J.)
Bactériologie . . .	{ GOUYGOU (Ch.)		{ ROBÉY (M.)
	{ NÉVOT (A.) <i>pr. s. ch.</i>	Orthopédie . . .	{ BRÉGEAT (P.)
	{ CHRISTOL (D.)		{ DESVIGNES (P.)
Biochimie médicale . . .	{ ETTORI (J.) <i>pr. s. ch.</i>	Oto-rhino- laryngologie . . .	{ AUBRY (M.)
	{ DESGREZ (P.)	Parasitologie . . .	{ MADURO (R.)
	{ POLONOVSKI (J.)		{ BRUMPT (L.-C.)
Biologie médicale	{ SCHAPIRA (R.)		{ CHABAUD (A.)
	{ BOURLIÈRE (F.)	Pathologie chirurgicale . . .	{ ABOULKER (P.)
Dermato- Syphiligraphie . . .	DUPERRAT (F.)		{ BARCAT (J.)
Embryologie . . .	Tuchmann-Duplessis (H.)		{ BAUMANN (J.)
Histologie . . .	{ COUJARD (R.)		{ CAUCHOIX (J.)
	{ N...		{ DUBOST (C.)
	{ N...		{ FAUREL (J.)
Hydrologie . . .	CORNET (A.)		{ FLABEAU (F.)
Hygiène . . .	{ BOYER (J.) <i>pr. s. ch.</i>		{ GERMAIN (A.)
	{ DEPARIS (M.) <i>pr. s. ch.</i>		{ GOSSET (J.)
Maladies infectieuses . . .	{ BASTIN (R.)		{ LAURENCE (G.)
	{ DEROBERT (L.) <i>pr. s. ch.</i>		{ LORTAT-JACOB (J.)
Médecine légale	{ GAULTIER (M.)		{ MATHEY (J.)
	{ HADENGUE (A.)		{ OLIVIER (Cl.)
Médecine du travail . . .	{ ALBAHARY (C.)		{ POILLEUX (F.)
	{ DAVID (M.)		{ THOMERET (G.)
Neuro-chirurgie			{ VERNE (J.-M.)
		Pathologie expérimentale . . .	{ LOEPER (J.)
			{ MAURICE (P.)

	MM.
Pathologie médicale	BODIN (G.)
	BOUVIER (J.-B.)
	BRICAIRE (H.)
	BRISSAUD (H.)
	CASTAIGNE (P.)
	CONTE (M.)
	DEROT (M.)
	DOMART (A.)
	LAMOTTE (M.)
	LAROCHE (C.-P.)
	MACREZ (Cl.)
	MILLIEZ (P.)
	PÉQUIGNOT (H.)
	PERRAULT (M.)
	RAMBERT (P.)
	ROYER (P.)
Pédiatrie	THIEFFRY (St.)
	TURIAF (J.)
	WOLFROMM (R.)
	N...
	JOSEPH (R.)
	MOZZICONACCI (P.)
	POLONOVSKY (Cl.)

	MM.
Pharmacologie	CHEYMOL (J.) <i>pr. s. ch.</i>
	LEVY (Mlle J.) <i>pr. s. ch.</i>
Physiologie . . .	BARJETON (D.) <i>pr. s. ch.</i>
	PARROT (J.) <i>pr. s. ch.</i>
	DEJOURS (P.)
Physique médicale	DJOURNO (A.) <i>pr. s. ch.</i>
	GOUGEROT (L.)
Pneumo- Phtisiologie . .	KREIS (B.)
Psychiatrie . . .	PICHOT (P.)
Psychiatrie infantile	MICHAUX (L.)
Rhumatologie . .	DELBARRE (F.)
Stomatologie . .	CERNÉA (P.)
	CHAPUT (Mme A.)
Thérapeutique .	CHASSAGNE (P.)
Urologie	KUSS (R.)

III. — PROFESSEURS SANS CHAIRE ET AGREGES CHARGES DE COURS DE CLINIQUE ANNEXE

A TITRE PERMANENT

	MM.
Clinique chirurgicale . .	AMELINE (A.)
	HUGUIER (J.)
	LÉGER (L.)
	PADOVANI (P.)
	ROUX (M.)
Clinique médicale	DREYFUS (Gilbert)
	HAGUENAU (J.) <i>pr. s. ch.</i>
	KOURILSKY (R.)
	MARCHAL (G.)
Clinique neurologique . .	DE SÈZE (S.)

	MM.
Clinique obstétricale . . .	MAYER (M.)
Clinique ophtalmologique	OFFRET (G.)
Clinique pédiatrique . . .	LAPLANE (R.)
Clinique psychiatrique .	BARUK (H.)

Secrétaire général de la Faculté	M. MOREL (J.)
Secrétaire	Mlle CHAINTREUIL (G.)

Conservateur, chargé de la direction	M. le Docteur HAHN (A.)
Conservateur	Mlle GOICHON (A.)
Bibliothécaires	Mlles DUMAITRE (P.), LAURENT (H.),
	LE NOIR (G.), QUIÉVREUX (E.)

Par délibération en date du 9 décembre 1798, l'Ecole a arrêté que les opinions émises dans les dissertations qui lui seront présentées, doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elle n'entend leur donner aucune approbation ni improbation.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

A MES PARENTS

A MA FEMME

AUX MIENS

A MONSIEUR LE PROFESSEUR R. FAUVERT

Titulaire de la Chaire de Biologie Médicale
à la Faculté de Médecine de Paris

*Qui m'a fait le grand honneur d'accepter
la présidence de cette thèse.*

Hommage respectueux.

A MES JUGES

A MONSIEUR LE MÉDECIN COLONEL J. JULLIARD
Directeur du Centre de Transfusion et Réanimation de l'Armée

*Il m'a fait l'honneur de m'accueillir au
C.T.R.A.*

Hommage respectueux.

A L'ASSOCIATION POUR L'ENTR'AIDE
A LA TRANSFUSION SANGUINE

*Puisse cet ouvrage contribuer à la noble
tâche qu'elle s'est fixée.*

A MONSIEUR LE MÉDECIN LIEUTENANT-COLONEL B. MAUPIN

Spécialiste des Hôpitaux Militaires

Docteur ès Sciences

Il m'a inspiré ce travail et m'a fait bénéficier de sa grande expérience.

Qu'il trouve ici l'expression de ma reconnaissance et de mon respectueux attachement.

A MONSIEUR LE MÉDECIN LIEUTENANT-COLONEL H. MASSON

Spécialiste des Hôpitaux Militaires
Chef du Service O.R.L. de l'Hôpital Bégin

Il m'a patiemment instruit dans une spécialité difficile qu'il m'a appris à aimer.

Hommage respectueux.

A MON CAMARADE DE PROMOTION

E. LEMOINE

A MON CAMARADE

J. FORESTIER

Spécialiste O.R.L.

A MONSIEUR LE VÉTÉRINAIRE COMMANDANT R. THEILLEUX

AU PERSONNEL DES LABORATOIRES
DU CENTRE DE TRANSFUSION - RÉANIMATION
DE L'ARMÉE

CHAPITRE 1

INTRODUCTION ET REVUE DE LA LITTÉRATURE

Le destin des globules blancs transfusés est mal connu. Il est admis qu'ils disparaissent très vite de la circulation du receveur, quelles que soient les précautions prises au moment de la récolte et du geste transfusionnel lui-même.

Cependant, leur apport apparaît nécessaire dans un certain nombre d'affections et tout spécialement les agranulocytoses. Il est paradoxal de constater que les éléments blancs apportés soit par le sang entier, soit sous forme de suspensions concentrées [25 - 50], ne demeurent pas dans la circulation des sujets qui en sont cependant dépourvus.

Ce fait n'a reçu jusqu'à présent qu'une explication partielle.

Avant d'exposer nos propres travaux, nous donnerons un aperçu rapide de la physiologie des leucocytes et une revue de la littérature.

I. — NOTIONS ACTUELLES SUR LA PHYSIOLOGIE DES LEUCOCYTES

Elles sont à vrai dire encore assez restreintes.

On connaît avec certitude, depuis METCHNIKOFF, le rôle des granulocytes dans la lutte contre l'infection microbienne par le mécanisme de la phagocytose. Les monocytes participent eux-mêmes à l'élimination de particules plus grossières, telles que les cadavres des granulocytes. Quant aux lymphocytes, le rôle qui leur a été prêté dans l'élaboration des anticorps demeure hypothétique.

Cependant, la pathologie nous montre, avec l'évolution souvent fatale des agranulocytoses, le rôle majeur des éléments figurés aptes à la phagocytose.

Par ailleurs, les leucocytes ne représentent pas une population homogène, et leur origine est variée puisque seuls les granulocytes prennent naissance dans la moelle osseuse (d'où le nom d'éléments de la série myéloïde), tandis que les monocytes proviennent du système réticulo-endothélial, et les lymphocytes des formations lymphoïdes éparses dans l'organisme.

Il est donc nécessaire de différencier d'emblée ces familles leucocytaires avant d'étudier leur devenir, qui peut être aussi divers que leur origine et leur rôle physiologique.

Quelle est la *durée de la vie* des leucocytes ? Les chiffres donnés sont extrêmement discordants, puisqu'ils varient, suivant les auteurs, de quelques minutes à quelques semaines. Il est raisonnable d'attribuer aux polynucléaires une durée de vie de neuf jours, tandis que les lymphocytes vivraient trente jours environ, d'après le travail récent de LISSAC [62]. Mais les discordances peuvent s'expliquer par une découverte récente : le séjour des leucocytes dans la circulation (ce que l'on est convenu d'appeler la *vie des leucocytes*) ne serait qu'épisodique et ne représenterait dans le temps qu'une mince fraction de la *vie réelle* des leucocytes.

Et cette hypothèse oblige à considérer qu'il existe des « organes-réservoirs », capables de séquestrer des leucocytes et de les libérer dans la circulation sous l'influence de stimuli divers.

Comme nous le verrons plus loin, de nombreux travaux ont été consacrés au problème de l'élimination, chez un sujet donné, de ses propres leucocytes. Nous ne retiendrons que ceux qui peuvent nous aider à éclairer le problème du *devenir des leucocytes exogènes*, c'est-à-dire des leucocytes transfusés.

II. — REVUE DE LA LITTÉRATURE

Certaines recherches ont été basées uniquement sur des techniques d'ordre hématologique ou physiologique.

Nous présenterons ensuite les recherches — dont plusieurs sont déjà anciennes — exécutées à l'aide de colorants chimiques, et à ce sujet, une place particulière sera réservée aux travaux de Jean BERNARD et de ses élèves.

A) TECHNIQUES D'ORDRE HÉMATOLOGIQUE OU PHYSIOLOGIQUE

En 1950, BIERMAN et ses collaborateurs [12] réalisent des transfusions de sang leucémique à des receveurs cancéreux, non leucé-

miques. Ils procèdent à une injection rapide de 400 à 500 cm³ de sang, contenant une quantité très importante de globules blancs, par voie intra-veineuse. Un cathétérisme des cavités droites permet un prélèvement dans le ventricule, qui, joint à l'examen du sang artériel, démontre l'élimination des leucocytes au cours de la traversée pulmonaire.

En 1950, OSOGOE [74] réalise la transfusion de lymphocytes en provenance de ganglions mésentériques du lapin, à un autre lapin adulte. Après injection dans la veine de l'oreille, se produit rapidement une accumulation diffuse et transitoire des lymphocytes dans les capillaires pulmonaires. Vingt-quatre heures après, les lymphocytes commencent à s'accumuler dans le foie et la rate. A l'opposé, l'injection dans la veine mésentérique est suivie de l'accumulation des lymphocytes dans les espaces-portes du foie, phénomène qui présente un maximum, non pas immédiatement mais après vingt-quatre heures. L'auteur ne précise pas le rôle du poumon dans ce cas.

En 1951, WEIDMAN et BUCHER [89] perfusent par du sang humain une préparation cœur-poumons de lapin. La totalité des polynucléaires et la moitié des lymphocytes sont retenus dès le premier passage.

En 1953, AMBRUS [2 - 5] réalise également de nombreuses expériences à l'aide de préparations cœur-poumons de chien. Les globules blancs sont rapidement éliminés du sang du chien hépariné. Des prélèvements de sang sont effectués avant et après la traversée du poumon. Ils montrent la séquestration des globules blancs par le poumon, essentiellement des polynucléaires neutrophiles. Cette fixation n'est pas inhibée par le thorotrast, puissant inhibiteur de l'activité phagocytaire du système réticulo-endothélial. A l'opposé, après l'introduction d'un sang pauvre en globules blancs, les poumons en libèrent, phénomène paraissant dû en partie au mélange avec le sang résiduel.

B) MARQUAGE DES LEUCOCYTES PAR DES COLORANTS CHIMIQUES

Parmi ces travaux, beaucoup sont d'emblée critiquables parce qu'ils utilisent des globules morts, par exemple les globules blancs du pus. Ils sont difficilement comparables en raison de la grande diversité des conditions expérimentales (choix des animaux, horaire du sacrifice, etc., etc.).

En 1926, SEYDERHELM et CESTREICH [78] marquent au rouge Congo des leucocytes « mourants » en provenance d'un empyème et les réinjectent au lapin dans la veine de l'oreille. La répartition des globules blancs s'opère dans tous les organes mais essentiellement dans le poumon. Si par contre l'injection est pratiquée dans la veine porte

ou dans l'artère splénique, la traversée du foie est suivie d'une disparition quantitative des globules blancs. Le foie apparaît donc capable d'éliminer de la grande circulation des quantités illimitées de globules blancs morts, qu'il détruit avec une rapidité surprenante.

En 1928, CHRISTELLER et EISNER [20], chez le chien, injectent du bleu trypan à 2 % dans un abcès sous-cutané provoqué trois jours auparavant par l'essence de térébenthine.

Le pus prélevé après quinze minutes, et lavé, est réinjecté soit dans la cavité cardiaque, soit dans l'aorte ou ses branches principales, soit dans les veines. Les globules blancs, après sacrifice de l'animal au bout de une à trois minutes, sont retrouvés dans le poumon.

En 1930, BORGHİ [17] retire chez le lapin, des globules blancs d'un exsudat péritonéal provoqué et les marque au rouge neutre. Il a pu les suivre pendant une heure, leur disparition étant ensuite progressive mais rapide. Les animaux étant sacrifiés dans des délais variables, on a pu retrouver des globules blancs marqués seulement dans le sang pulmonaire et la rate.

En 1934, UNGAR et WILSON [86] réalisent des auto-transfusions de polynucléaires d'exsudat péritonéal chez des lapins injectés au préalable au carmin ou au carbone ; perfusés par voie intracardiaque ou intraportale, les leucocytes marqués au carbone sont toujours rapidement concentrés dans le poumon, libres dans les alvéoles. Les cellules marquées au carmin n'ont pas une distribution aussi fixe : parfois elles apparaissent exclusivement dans les poumons, ailleurs surtout dans le foie.

En 1946, FARR [31] pratique, chez le lapin, la transfusion d'un sang dont les leucocytes ont été marqués par l'acriflavine. Un petit nombre de ces leucocytes transfusés demeure en circulation pendant soixante à soixante-douze heures. Chez le lapin, la transfusion de leucocytes est suivie d'une leucopénie qui dure deux à quatre heures, puis d'une leucocytose.

En 1954, WHITE [97] utilise l'atébrine (ou quinacrine, colorant qui a été repris dans les expériences de Jean BERNARD et LISSAC). Chez 10 malades, sont pratiquées des transfusions de sang renfermant des globules blancs marqués. Les leucocytes sont retrouvés pendant trente à quatre-vingt-dix minutes dans la circulation périphérique du receveur.

En 1955, BERNARD, MATHÉ, LISSAC [9 - 61] expérimentent chez le lapin qui reçoit ses propres leucocytes marqués par la quinacrine (20 à 30 cm³ de sang), ou bien est préparé par injection de quina-crine dans la moelle tibiale. Ils concluent :

- 1° que les globules blancs ne demeurent dans le sang périphérique que quinze à trente minutes ;
- 2° qu'ils séjournent de deux à vingt heures dans le poumon, mais que leur nombre commence à décroître vers la troisième heure tandis qu'il augmente dans le foie, le rein et l'ensemble du tissu lymphoïde ;
- 3° qu'ils ne sont dans le poumon qu'en transit. À partir de la vingtième heure, on les retrouve en effet dans d'autres viscères, la rate en particulier.

En 1956, LISSAC dans sa thèse [63] reprend ces expériences et marque les leucocytes, soit « *in vitro* » pour les utiliser alors en auto-transfusion, soit « *in vivo* » par injection de quinacrine dans les veines, la moelle osseuse ou dans l'artère pulmonaire, cette dernière méthode permettant de marquer la totalité des globules blancs présents dans le poumon. Il note la fixation par le poumon de la quasi-totalité des polynucléaires marqués à la trentième minute, leur disparition nette et progressive dès cet instant à partir de ce viscère et l'élévation de leur taux dans les autres organes, notamment dans la rate. De plus, « il existe une circulation périphérique des cellules blanches, portant sur un contingent très faible », notée pendant plusieurs heures (quatre à quarante-huit heures). LISSAC modifie par ailleurs les conditions d'expérience pour déterminer le rôle du poumon et nous citons ses conclusions à ce sujet :

« Grâce au marquage par un indicateur fluorescent, il est démontré que, dans la leuco-neutropénie induite par choc histaminique, le poumon apparaît comme l'organe essentiel sinon exclusif de la séquestration des polynucléaires.

« Ce rôle privilégié est également démontré par des arguments histologiques ou par des comparaisons du sang à l'entrée et à la sortie du poumon, dans d'autres conditions expérimentales : leucopénie anaphylactique, leucopénie par choc bactérien ou protéique, leucopénie immunologique.

« Dans l'hyperleucocytose aiguë induite par injection d'adrénaline, le poumon est la source, à lui seul, d'une grande part de l'afflux des polynucléaires dans le sang périphérique, surtout dans les premières minutes de l'ascension leucocytaire. »

Il faut faire une place aux expériences pratiquées à l'aide de *lymphocytes* dont la localisation après leur injection est particulière.

C'est ainsi que, en 1951, FARR [30] transfuse des lymphocytes provenant des ganglions poplités, marqués par un dérivé de l'acridine, à des lapins. La plupart des lymphocytes marqués disparaissent de la circulation dans les quatre-vingt-dix minutes.

Après deux heures, il trouve des lymphocytes à noyau coloré dans les tissus lymphatiques, y compris le thymus, les ganglions mésentériques, l'appendice, les plaques de Peyer et la pulpe blanche de la rate.

Les autres organes ne contiennent pas de lymphocytes marqués. Après douze heures, des lymphocytes sont retrouvés dans le tissu lymphatique, mais à ce moment, la plupart des lymphocytes marqués de la moelle sont apparemment transformés en myélocytes.

De même, en 1953, Fukui [37] marque par l'acridavine des lymphocytes extraits du ganglion poplité et les réinjecte par voie intraveineuse, intrapéritonéale ou pleurale. Leur devenir est le même : ils se fixent dans la moelle où ils semblent se transformer après douze heures en myélocytes et également après douze heures dans la rate et les ganglions lymphatiques, notamment ceux du tube digestif.

C) MARQUAGE DES LEUCOCYTES PAR DES RADIOISOTOPES

Mettons à part l'essai intéressant de VALLÉE et FLUHARTY (1947) [87] marquant les leucocytes « *in vivo* » par injection de Zn^{65} . On sait que les leucocytes contiennent du zinc, dont les plaquettes sont dépourvues. Le zinc entre donc dans le métabolisme normal du leucocyte.

Signalons tout de suite que ce travail déjà ancien n'a pas été repris, à notre connaissance.

La plupart des auteurs ont utilisé le radiophosphore pour marquage « *in vivo* ». Nous nous bornerons ici à citer quelques résultats.

a) Marquage « *in vivo* » :

C'est celui qui a le plus d'intérêt physiologique, car il pénètre ainsi dans l'intimité du leucocyte sans l'altérer, du moins en apparence.

Déjà, en 1941, ERF et LAWRENCE [28] utilisent le P^{32} par voie intraveineuse et « *per os* » chez des individus normaux ou leucémiques. Dans le sang total, l'activité est maxima entre six et vingt-quatre heures après l'injection intraveineuse.

Mais l'expérience capitale est celle de WEISBERGER et de ses collaborateurs qui, dès 1949 [91 - 92 - 93] utilisent des leucocytes de lapin retirés d'un *exsudat péritonéal* et marqués préalablement « *in vivo* » par injection intraveineuse de P^{32} .

Ces leucocytes sont réinjectés au même lapin ou à d'autres. Les résultats sont identiques, montrant une leucopénie dans les premières

minutes, suivie, au bout de deux ou trois heures, dans la majorité des cas, d'une leucocytose. Ces effets sont obtenus également par l'injection de globules blancs désintégrés par ultra-sons.

Le sacrifice des animaux au bout de trente minutes donne :

	<i>Activité moyenne par g d'organe</i>	<i>% R.A. totale</i>
Poumon	3,06	47,06
Foie	0,24	21,91
Rate	0,65	1,82
Reins	0,15	2,63

tableau qui montre le rôle essentiel dévolu au poumon.

Les sacrifices pratiqués après 4 ou 6 heures montrent un transfert de la radio-activité vers le foie :

	<i>Activité moyenne par g d'organe</i>	<i>% R.A. totale</i>
Poumon	1,50	17,7
Rate	1,58	2,93
Foie	0,39	35,60
Reins	0,08	1,57

L'identité des résultats après injection artérielle exclut l'intervention des capillaires périphériques.

En 1954, LEAHY et ses collaborateurs [58 - 59], utilisant la même méthode de marquage que WEISBERGER, apportent les résultats suivants, exprimés en pourcentage de l'activité totale injectée :

<i>Horaire du sacrifice</i>	<i>Poumon</i>	<i>Foie</i>	<i>Rate</i>
3 à 4 minutes (moy de 3 animaux)	72	2,9	0,05
3 heures	20	34	0,2
5 heures	13	36	1,1
24 heures	4	20	2,8

tandis que l'injection de P^{32} inorganique donne :

<i>Horaire du sacrifice</i>	<i>Poumon</i>	<i>Foie</i>	<i>Rate</i>
3 minutes	1,3	12	0,33
3 heures	1,2	29	0,25
5 heures	1,2	16	0,22

Ces expériences montrent une fois de plus le rôle important du poumon qui séquestre momentanément un fort pourcentage de leucocytes, séquestration dont l'importance décroît ensuite en faveur du foie.

Comme précédemment, l'injection de *lymphocytes* marqués présente des caractères particuliers, ainsi qu'en témoignent ici les expériences de FICHTELIUS (1951) [33 - 34 - 35] : il prépare des lapins et des rats par de grandes quantités de P^{32} . Le thymus est coupé en morceaux et lavé, le surnageant après sédimentation d'une heure est injecté à d'autres animaux. Lorsque les lymphocytes sont réinjectés à des rats, la radioactivité se localise essentiellement au niveau du foie et de la rate ; cette deuxième localisation est beaucoup moins importante dans le cas d'hétéro-transfusion de lapin à rat.

Ces données sont en opposition avec celles qu'apportent WEISBERGER et ses collaborateurs en 1950 et 1951 [44 - 90] qui injectent au rat du P^{32} par voie intra-péritonéale. Vingt-quatre heures après, des lymphocytes du canal thoracique sont recueillis par cathétérisme et transfusés à d'autres rats. Les résultats sont comparés à ceux obtenus par injection intra-veineuse de P^{32} inorganique. L'injection de grandes quantités de lymphocytes est suivie d'une leucopénie dans les premières minutes.

Le prélèvement des organes, 10 à 15 minutes après l'injection, montre une fixation importante au niveau des poumons et du foie, le poumon fixant plus que le foie par gramme d'organe. Cette radioactivité pulmonaire est 15 fois égale à celle enregistrée chez les rats témoins. La rate possède une radioactivité accrue, de trois fois celle des témoins, l'activité du foie et des reins restant comparable. L'injection intra-artérielle fournit les mêmes résultats.

D'autres auteurs ont marqué « *in vivo* » les *leucocytes leucémiques* pour étudier leur délai de vie apparente dans la circulation (OSGOOD et collaborateurs, par le P^{32} en 1952 [73] ; MAC CALL en 1955 par le Cr^{51} [64]).

b) *Marquage « in vitro » :*

Il est réalisé en 1955 par MAC CALL [64] qui marque des *leucocytes pathologiques* de leucémie aiguë, de leucémie chronique, lymphoïde ou myéloïde, par $\text{Cr}^{51} \text{O}_4 \text{Na}_2$. Lorsque ces leucocytes sont réinjectés par voie intraveineuse au sujet même qui les a fournis (auto-transfusion), le maximum d'activité du sang circulant est noté après 10 minutes, et l'on retrouve dans l'espace intravasculaire seulement 18 à 20 % de la radioactivité totale injectée. Le malade ne présente pas de réactions cliniques ni de modifications de sa formule blanche.

Fait intéressant : les différentes parties du corps ont pu être explorées par un compteur à scintillations, et de fortes concentrations de Cr^{51} ont été localisées dans les régions correspondant à la *rate*, au *foie* et aux *poumons*. L'activité relative de chaque organe est demeurée la même pendant plusieurs semaines chez le sujet étudié.

CHAPITRE II

TECHNIQUES DE MARQUAGE DES LEUCOCYTES PAR LES RADIO-ISOTOPES

I. — HISTORIQUE ET CONDITIONS GENERALES DU MARQUAGE

Le chercheur est guidé, dans le choix d'un traceur destiné au marquage cellulaire, par diverses considérations d'ordre physique ou biologique, notamment :

- l'absence de toxicité de l'élément chimique vis à vis de la cellule ou de l'organisme receveur ;
- la durée de vie du radio-élément ;
- son aptitude à pénétrer dans la cellule elle-même et à s'y maintenir après le lavage.

Il est préférable d'utiliser un élément qui soit représenté chimiquement dans la cellule considérée, en vue d'assurer sa pénétration par les voies normales du métabolisme. Mais nous pouvons retenir toute autre possibilité d'incorporation qui n'altère pas la cellule.

C'est ainsi que le phosphore, le carbone, le soufre, le zinc remplissent la première condition ; et l'on a utilisé le P^{32} , le C^{14} , le S^{35} , le Zn^{65} pour le marquage des leucocytes.

Mais le Cr^{51} et le Se^{75} ont permis le marquage *in vitro* bien que leurs isotopes stables n'existent pas normalement au sein des leucocytes.

A) MARQUAGE PAR LE P^{32} (« *in vivo* » ou « *in vitro* »)

On sait que le P^{32} est rapidement incorporé dans les acides nucléiques et pénètre donc à la fois dans le noyau et le cytoplasme des cellules vivantes. Pour nous limiter au cas particulier des leucocytes, notons que dès 1941, ERF et LAWRENCE [28] administrant du P^{32} à des sujets normaux ou leucémiques, ont constaté l'apparition

d'une activité sur les leucocytes, avant tout autre élément figuré du sang. Les leucocytes normaux se marquent plus vite que les leucocytes de leucémie lymphoïde ou myéloïde, et le P^{32} administré par voie veineuse se fixe plus rapidement que s'il est ingéré par voie buccale.

De nombreux auteurs ont utilisé cette précieuse propriété d'incorporation dans les leucocytes pour étudier le « turn over » ou renouvellement du P^{32} ribonucléique et désoxyribonucléique, dans les conditions normales ou pathologiques. Citons entre autres :

OSGOOD et coll. (1952) [73] ;

BARDAWILL et coll. (1953) [8] ;

KLINE et CLIFTON (1952) [53].

Peu de temps après son administration, le P^{32} est fixé par la moelle osseuse et il apparaît dans les cellules jeunes de la lignée myéloïde (après 4 à 6 heures) avant de se manifester dans le sang (ce qui demande environ 18 heures). Ainsi MORSE (1952) [71] a-t-il pu obtenir, chez le rat qui a reçu des doses importantes de radiophosphate, des autoradiographies très concluantes de la moelle osseuse et du sang.

Pour permettre la comparaison avec les expériences de JULLIARD, MAUPIN et LOVERDO (1952), rappelons la technique de WEISBERGER et coll. (1949). Ces auteurs marquent « *in vivo* » les leucocytes du lapin en provoquant chez cet animal l'apparition d'un exsudat péritonéal — 6 à 7 jours après injection intraveineuse d'une dose d'environ 1 mc de P^{32} sous forme de radiophosphate — par deux injections à 15 heures d'intervalle, de 300 à 500 cc de sérum physiologique. Le péritoine est ponctionné après 4 heures et les cellules de l'exsudat, lavées trois fois, présentent une activité significatives. Elles sont constituées en majorité par des leucocytes polynucléaires (environ 90 %). La quantité de radioactivité retrouvée dans les globules blancs utilisés représente 1 à 6 % du P^{32} injecté au départ, soit 10 à 60 μ c.

B) MARQUAGE PAR LE Zn^{65}

C'est à VALLÉE et FLUHARTY (1947) [87] que l'on doit l'essai de ce traceur. Ces auteurs, ayant décelé la présence de zinc dans les leucocytes du chien et ceux de l'homme, ont vérifié qu'ils fixaient une partie du Zn^{65} administré par voie intraveineuse, mais à un faible degré.

Un peu plus tard, TUPPER, WATTS et WORMALL (1951) [83] ont entrepris de marquer *in vitro* les globules blancs d'un sang hépariné par contact de 2 heures à $+37^{\circ}$ C avec une solution de $Zn^{65} Cl_2$, additionnée de glycine et portée à pH : 7,4. Après trois lavages, l'ac-

tivité est mesurée. Dans le sang du lapin, les leucocytes fixent 8 fois plus de zinc que les globules rouges (ceux-ci contiennent du zinc, localisé probablement dans l'anhydrase carbonique). Les auteurs notent une diffusion rapide du Zn^{65} vers le milieu ambiant, ce qui impose des expériences courtes.

Le marquage par le Zn^{65} n'a pas reçu, à notre connaissance, d'autres applications.

C) MARQUAGE PAR LE S^{35}

WEISBERGER et SUHRLAND (1955) [94 - 95 - 96] ont étudié comparativement l'incorporation de la l-Cystine marquée sur le S^{35} et du S^{35} - sulfate de sodium, dans les leucocytes normaux et leucémiques. Dans tous les cas, l'incorporation est mieux réalisée lorsque le S^{35} est fourni sous forme de l-cystine. Elle est plus rapide dans les leucocytes immatures du sang. La température optima pour la fixation « *in vitro* » est celle de $+ 37^{\circ} C$.

Cette méthode semble mieux convenir à l'étude du métabolisme du soufre dans les leucocytes, qu'à celle de leur devenir après transfusion. Une difficulté tient sans doute à la mesure de l'activité du S^{35} dans les échantillons d'organe : les rayons mous de ce radioisotope exigent en effet l'emploi d'un compteur sans fenêtre à écoulement continu et la calcination des échantillons n'est pas réalisable.

D) MARQUAGE « *in vivo* » PAR LE Fe^{59}

SIMMONS et EVERETT (1954) [79] ont étudié le métabolisme du fer par les leucocytes en administrant à des rats, par diverses voies, 15 à 30 microcuries de chlorure ferrique - Fe^{59} .

Dans les jours qui suivent, les rats sont saignés et les leucocytes séparés par la technique de sédimentation au fibrinogène de MINOR et BURNETT : on vérifie que l'activité est bien liée aux globules blancs, ceux-ci se marquant plus précocement que les globules rouges.

Le Fe^{59} semble associé, dans les leucocytes, à des protéines hydro-solubles qui n'ont pu être caractérisées que partiellement, 12 % se trouverait sous forme de ferritine.

Rapprochons de ceci, à titre de curiosité, l'élégante expérience de LEVINE (1956) [60] qui fait absorber des particules de fer par des leucocytes, dans le but de séparer ensuite ceux-ci par attraction magnétique : il s'agit là d'un phénomène entièrement différent, la phagocytose de fer particulaire, avec l'empois d'amidon comme entraîneur, ne pouvant se comparer à une incorporation chimique.

E) MARQUAGE PAR LE Se^{75}

Il a été réalisé par MAC CONNELL (1954) [65] injectant à des chiens du $\text{Se}^{75} \text{Cl}_4$ par voie sous-cutanée. Les leucocytes sont ensuite isolés par la méthode de sédimentation au fibrinogène. Le sélénium semble lié aux protéines, au moins pour 80 à 90 %.

F) MARQUAGE PAR LE Cr^{51}

C'est seulement en 1955, postérieurement au début de nos travaux, que nous en avons trouvé mention dans la littérature. On sait que le Cr^{51} sous forme de chlorure, a été utilisé pour le marquage des protéines du plasma, et aussi des plaquettes sanguines (ROBERTSON et MILNE). Sous forme de chromate, le même radio-isotope se fixe avec intensité sur les globules rouges, mais il marque également les plaquettes (voir thèse de LEMOINE, Paris, 1957) et les leucocytes, lorsque ces éléments sont séparés avec une pureté suffisante.

MAC CALL, SUTHERLAND, EISENTRAUT et LANZ (1955) [64] présentent ainsi un travail important, puisqu'ils étudient la survie de leucocytes normaux ou leucémiques, auto-transfusés après marquage « in vitro ». Ils ont tenté aussi avec succès un marquage « in vivo » par le même radiochromate. Nous exposerons donc leur travail avec quelques détails, surtout le marquage « in vitro » qui rentre plus spécialement dans notre sujet.

1) Technique :

Ils obtiennent par la sédimentation de 50 à 100 ml de sang veineux, prélevé sur solution A.C.D. (acide citrique — dextrose), un plasma riche en leucocytes. Celui-ci est additionné d'une solution isotonique renfermant le Cr^{51} et après incubation de vingt minutes à une heure, à $+37^\circ \text{C}$, les leucocytes sont lavés trois fois. On contrôle la pureté cytologique (moins de 1 globule rouge pour 50 globules blancs) et la viabilité des leucocytes séparés.

Les contrôles portent en outre sur l'efficacité et la stabilité :

- l'efficacité du marquage atteint 5 à 85 % selon les échantillons ; elle n'est donc pas prévisible ;
- la fixation du Cr^{51} sur les leucocytes résiste au traumatisme mécanique des lavages successifs. Cependant, si les leucocytes sont laissés au repos quelques heures, il apparaît du Cr^{51} dans le milieu ambiant : le radioisotope n'est pas lié aux protéines ni aux débris cellulaires, ainsi que l'indiquent les épreuves de

dialyse et de précipitation des protéines par l'acide trichloroacétique. Mais sa libération résulterait, pour les auteurs, de l'action d'enzymes hydrolysantes sur les protéines cellulaires.

Les auteurs ont en outre vérifié l'absence de marquage secondaire des globules rouges ou des globules blancs par le Cr^{51} ainsi libéré.

2) Séparation des leucocytes en vue de la mesure d'activité :

Notons encore deux méthodes appliquées par ces auteurs à la séparation des leucocytes chez les sujets transfusés :

- centrifugation à grande vitesse d'un échantillon de sang dans un tube de celluloid, qui est immédiatement congelé dans un mélange sec de glace et d'acétone (-60°C) et sectionné par une forte scie pour isoler la couche leucocytaire ;
- étude portant sur un plasma de sédimentation riche en leucocytes : on centrifuge et on lave trois fois le culot obtenu avec une solution diluée de saponine.

Avant mesure, ce culot est lysé par une solution de soude et ramené au volume de 4 ml.

Pour terminer, notons que l'application des radioisotopes à l'étude des leucocytes a fait l'objet d'une revue par HAMILTON au VI^e Congrès de la Société Internationale d'Hématologie [41]. Cet auteur mentionne les C^{14} , P^{32} , S^{35} , Cr^{51} et Zn^{65} , et souligne l'intérêt de leur emploi dans l'exploration des divers métabolismes et la détermination du temps de survie moyen pour chaque type cellulaire. On peut également étudier le mode d'action des agents chimiothérapeutiques et vérifier des hypothèses relatives à l'élaboration des anticorps par les lymphocytes.

A notre connaissance, l' Au^{198} colloïdal n'a pas encore été proposé pour le marquage des leucocytes.

II. — TECHNIQUES UTILISÉES AU CENTRE DE TRANSFUSION ET RÉANIMATION DE L'ARMÉE

Nos propres expériences visent à la connaissance du sort des leucocytes humains transfusés : or, nous ne disposons pas de sujets humains traités par le P^{32} et il aurait fallu des doses considérables de ce radioisotope pour obtenir une activité significative des leucocytes.

Du fait que les expériences de transfusion portent nécessairement sur des leucocytes extravasés, nous considérons que les altérations résultant éventuellement du marquage « in vitro » constituent un risque acceptable. Il n'en eût pas été de même si notre but avait été l'étude de la durée de survie des leucocytes.

Mais le marquage par le P^{32} utilisé tout naturellement dans les premières expériences du Centre de Transfusion de l'Armée, se révéla trop labile pour permettre l'exploitation à long terme d'une expérience.

On en vint à chercher d'autres radioisotopes, et c'est par analogie avec les plaquettes que le Cr^{51} (sous forme de chromate) a été essayé, tandis que l' Au^{198} colloïdal a été suggéré par l'hypothèse d'une phagocytose active des leucocytes à l'égard des particules d'or colloïdal.

L'expérience a confirmé ce choix, et la qualité du marquage obtenu est nettement supérieure à celle du marquage par le radiophosphore : la stabilité (surtout dans le cas de l'or colloïdal) est remarquable.

Parallèlement à ce choix du Cr^{51} et de l' Au^{198} colloïdal — qui appliqué aux leucocytes fait innovation — des progrès techniques importants ont été réalisés dans le domaine de la séparation des leucocytes eux-mêmes à partir du sang humain. Un degré de pureté très satisfaisant a été atteint.

Tant il est vrai que finalement le choix des méthodes est essentiellement conditionné par l'objectif recherché, plus que par des considérations purement théoriques.

* *

Nous exposerons successivement :

- le marquage par le radiophosphore ;
- le marquage par le radiochromate ;
- le marquage par le radio-or colloïdal.

A) MARQUAGE « in vitro » DE LEUCOCYTES HUMAINS PAR LE P^{32}

Nous serons brefs sur cette technique qui a été utilisée antérieurement à notre arrivée et qui est délaissée au profit de techniques plus récentes.

On sait que le P^{32} émet des rayons bêta de forte énergie (1,701 M.e.v.) ; sa demi-vie est de 14,3 jours.

En octobre 1950, le Médecin Commandant MAUPIN, sur les conseils de Monsieur LOVERDO (*), a tenté de marquer les leucocytes en ajoutant à 400 ml de sang entier, citraté, 200 micro-curies de P^{32} , et en portant le tout dans un bain-marie à $+ 37^{\circ} C$ pendant deux heures. Les résultats ne furent pas satisfaisants ; aucune sélectivité dans la fixation du P^{32} ne se manifestait en faveur des leucocytes.

La mise en contact du P^{32} avec des leucocytes déjà séparés et concentrés permit, dans les expériences ultérieures, de fixer sur les leucocytes près de 10 % de l'activité totale. Au début, les conditions de lavage et de purification étaient très imparfaites. Cependant la concordance des résultats obtenus avec ceux de WEISBERGER, en ce qui concerne l'injection au lapin des leucocytes ainsi marqués, constituait d'emblée un précieux encouragement.

Technique

1) Récolte des leucocytes :

Elle est décrite plus loin au sujet du marquage par le Cr^{51} .

Notons que les premières expériences de marquage par le P^{32} utilisaient des leucocytes moins bien séparés et surtout soumis à une série de centrifugations assez brutales. En effet, les leucocytes marqués étaient repris après des centrifugations de l'ordre de dix minutes à 3.400 tours correspondant à 1.500 g et l'on recueillait à chaque fois la partie supérieure du culot, sous forme d'une crème épaisse que l'on dissociait difficilement des globules rouges.

2) Solution marquante :

Radiophosphate de haute activité spécifique, fourni en solution isotonique. Les doses utilisées étaient considérables, de 4 à 10 mC, en raison de l'efficacité réduite du marquage et du défaut de sensibilité du compteur de Geiger-Muller.

3) Marquage proprement dit :

La crème leucocytaire séparée par la méthode de MAUPIN et CHARY [69] était recueillie dans un pot de 100 ml et additionnée de la solution marquante. Le tout était porté au bain-marie à $+ 37^{\circ} C$ pendant deux heures et l'on agitait toutes les dix minutes.

(*) De l'Institut National d'Hygiène, attaché au Laboratoire Central de l'Hôpital Beaujon (Service de M. le Prof. R. FAUVERT).

Les centrifugations ultérieures avaient pour but d'éliminer le radiophosphate non fixé, chacune des solutions surnageantes était recueillie pour mesure d'activité.

4) *Injection à l'animal :*

La crème leucocytaire est diluée par une solution isotonique. L'injection est pratiquée dans la veine marginale de l'oreille. Les seringues sont tarées avant et après l'injection. Des prélèvements de contrôle ont été effectués (numération et frottis, dilution pour mesure de la radioactivité).

Après un délai qui est habituellement de vingt minutes, l'animal est sacrifié. On prélève dans l'ordre : sang du cœur, poumon, foie, rate, reins, moelle osseuse. Les organes sont pesés, et des échantillons de poids connu portés dans des coupelles de pyrex en vue de calcination. Le sang est desséché à l'étuve à $+37^{\circ}\text{C}$.

5) *Mesure de la radioactivité :*

Pour les organes et les prélèvements de contrôle, elle s'opérait à l'échelle automatique de 4.096, à l'aide d'un compteur de Geiger-Muller à fenêtre de mica de $1,7\text{ mg/cm}^2$, et les valeurs notées ont été soumises aux corrections habituelles (mouvement propre, auto-absorption).

Seules les expériences d'ordre chimique ont été suivies à l'aide d'un compteur à liquide.

On détermine pour chaque organe le C.A.D. ou coefficient d'absorption différentiel (équivalent du D.A.R. des auteurs anglo-saxons) et le pourcentage de la radioactivité fixée par rapport à la quantité totale injectée.

B) MARQUAGE « in vitro » DE LEUCOCYTES HUMAINS PAR LE Cr^{51}

Le Cr^{51} émet un rayonnement K et des rayons gamma de moyenne énergie (0,323 M.e.v.).

La demi-vie est de 27,8 jours.

Rappelons que le chlorure de chrome $\text{Cr}^{51}\text{Cl}_3$ se fixe de préférence sur des protéines, et que ROBERTSON et MILNE l'ont proposé en 1954 pour le marquage des plaquettes sanguines ; que le chromate de sodium $\text{Cr}^{51}\text{O}_4\text{Na}_2$ est utilisé depuis longtemps pour le marquage des hématies (études de survie, détermination de la masse sanguine, etc., etc.).

Nous examinerons le détail des techniques que nous avons utilisées pour nos expériences.

1) *Récolte des leucocytes* [68 - 69] :

a) Le sang est recueilli sur citrate dans des flacons « standard » de 500 cm³, siliconés : il est centrifugé trente minutes à 2.600 tours-minute, puis privé de son plasma par pipetage aseptique.

b) Le tapis leucocyto-plaquettaire (« buffy coat » des auteurs anglo-saxons) mis en évidence par la centrifugation précédente, est constitué de la majorité des plaquettes et des leucocytes qui ont quitté le plasma sans pénétrer dans le culot globulaire rouge. Ses éléments en sont aisément dissociables. On prélève aseptiquement ces tapis leucocyto-plaquettaires à l'aide d'une pipette recourbée à son extrémité, raccordée à une trompe à eau, et sous une faible dépression de manière à éviter le moussage. On réunit ainsi les éléments blancs de 10 à 12 flacons de sang dans un seul flacon de même modèle. L'admission de plasma étant peu importante tandis qu'il pénètre des globules rouges, le résultat est une *suspension globulaire enrichie*.

c) Cette préparation est centrifugée treize minutes à 2.500 tours-minute, temps optimum car au-dessous, la séparation est imparfaite, tandis qu'au delà, se produit un tassement excessif des éléments cellulaires, les couches globulaires devenant cohérentes.

Cette centrifugation individualise quatre couches, qui sont constituées respectivement :

1° de plasma ;

2° d'une couche plaquettaire nettement apparente, d'une épaisseur de 3 à 4 mm, de couleur beige ;

3° d'une couche leucocytaire, de couleur jaune verdâtre clair, à reflets rosés, d'une épaisseur de 2 mm ;

4° d'un culot globulaire rouge.

d) Sur le tube centrifugé est monté le dispositif décrit par le Médecin Commandant MAUPIN en 1952 [69] et qui se prête aisément à la stérilisation. C'est un tube conique en pyrex, qui repose à sa base, par un joint d'élastomère de silicone, sur le goulot du flacon (37 mm de diamètre interne) qu'il prolonge exactement et auquel il est adapté par une virole métallique indépendante. Sa section se réduit régulièrement jusqu'à 4 mm, il se coude et se termine par une olive.

Sur le tube est soudée latéralement une tubulure de pyrex de 6 mm de diamètre qui descend à 1/2 cm du fond du flacon. A son extrémité externe, il est relié par un tube souple à une dérivation

en T. A cette dérivation en T, sont reliés également une trompe à vide et un ballon stérile, monté sur un support, contenant une solution de glucose de densité 1,200. Dès lors, on opère comme suit :

1) Le glucose étant exclu, on aspire doucement la purée globulaire rouge jusqu'au tube en T.

2) Le tube conique étant exclu, on aspire le glucose jusqu'à élimination des dernières bulles d'air.

3) Le siphon étant ainsi amorcé, on cesse l'aspiration. Le liquide dense se présente à la partie inférieure du flacon et les différentes couches sont lentement soulevées dans l'ordre inverse de leur densité. Une pince de Mohr, placée sur le trajet de la solution glucosée, permet de régler le débit.

On recueille ainsi successivement dans des récipients séparés :

1° le plasma résiduel ;

2° les plaquettes (25 cm^3 en moyenne) ;

3° les leucocytes dont la couche se différencie nettement de celle des plaquettes par leur coloration et leur viscosité beaucoup plus grande. Pour gagner en pureté, on peut éliminer 1 cm^3 de la partie intermédiaire à la couche plaquettaire qui présente un gradient de coloration difficilement appréciable, et 1 à 2 cm^3 de la partie terminale qui présente une teinte plus rosée. On recueille ainsi 15 cm^3 en moyenne de crème leucocytaire ;

4° les hématies.

2) *Solution marquante :*

Le radiochromate de sodium provient de la pile de Harwell (Grande-Bretagne) et nous a été fourni par le laboratoire central de l'hôpital Beaujon. Il possède une haute activité spécifique. Les solutions marquantes que nous avons utilisées présentaient une activité variant entre 250 et 500 microcuries par millilitre au moment de l'expérience, et une teneur en chrome élément de l'ordre de 25 à 45 microgrammes par millilitre.

À titre d'indication, 1 microcurie, dans un tube à collerette de 3 ml, donne à notre compteur à scintillations 60.000 impulsions par minute.

3) *Choix du délai et des doses optima de marquage :*

Il a été défini dans des expériences préliminaires dont les résultats seront examinés au sujet des contrôles. Ces expériences nous ont démontré que le délai de dix minutes paraît procurer un rendement suffisant, la stabilité n'étant pas accrue par une incubation plus longue.

En ce qui concerne les doses utilisées, une activité de 2 millicuries environ pour 12 grammes de crème leucocytaire semble réaliser un optimum.

4) Marquage :

A la crème leucocytaire, recueillie sous un volume de 12 ml dans un tube à centrifuger de 100 ml siliconé, on ajoute 2 millicuries de la solution de radiochromate de sodium, sous un volume d'environ 6 ml.

Le tube est ensuite mis au bain-marie à $+37^{\circ}\text{C}$ pendant dix minutes.

5) Lavages :

Jusqu'à présent, la crème leucocytaire, encore contaminée par de nombreux globules rouges, possède une teinte rosée.

Les différentes phases du lavage vont permettre d'éliminer le chrome ⁵¹ non fixé et la majorité des globules rouges et des plaquettes restants.

La méthode repose sur le phénomène de sédimentation décrit par MAUPIN [68].

A la crème leucocytaire, on ajoute de l'eau physiologique jusqu'à un volume de 100 cm³. On centrifuge trente-cinq secondes au deuxième plot de la centrifugeuse Jouan, ce qui correspond à une accélération maxima de 300 g. A l'arrêt, le tube présente deux couches (fig. 1) :

- un surnageant qui est trouble et contient la majorité des globules rouges ;
- un culot important dont la teinte est nettement plus claire.

Une centrifugation plus longue entraînerait le dépôt de globules rouges à la surface du culot leucocytaire.

Puis le surnageant est pipeté au ras du culot et conservé. On pratique un deuxième lavage dans les mêmes conditions. Un troisième lavage est pratiqué par sécurité mais on obtient en général dès le second un culot blanc verdâtre d'aspect homogène. La présence d'agglutinats de globules rouges visibles à l'œil nu est exceptionnelle.

On obtient ainsi (fig. 2) une crème leucocytaire très purifiée qui n'a fixé qu'une faible partie de l'activité utilisée par son marquage (9 %) et qui présente les caractéristiques suivantes :

- haute teneur en globules blancs (800.000/mm³) ;
- moins de 1 globule rouge pour 100 globules blancs ;
- plaquettes au nombre de 0,5 à 5 pour 1 globule blanc.

Toutes ces opérations sont pratiquées sans transvasement, il n'y a pas de culot, et les mesures de contrôle portent ici uniquement sur les surnageants.



FIG. 1 (ci-contre) : Aspect après la première centrifugation

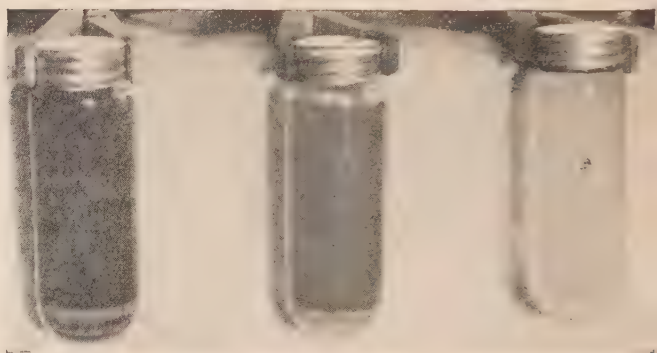


FIG. 2 (ci-dessous) : Aspect après trois centrifugations successives

6) Récolte de la crème leucocytaire :

Celle-ci est transvasée dans une ventouse siliconée et tarée, tarée à nouveau et additionnée d'eau physiologique en quantité suffisante pour permettre l'injection aux animaux, la quantité injectée représentant 4 à 6 cm³ par animal suivant son poids.

Sur cette récolte, on prélève :

- 1 ml pour contrôle d'activité ;
- 1 ml pour contrôle hématologique (fig. 3).

7) Injection aux animaux :

Une seringue est tarée avant, puis après injection, pour déterminer la quantité administrée (différence de poids entre la seringue pleine et la seringue vide). L'injection est pratiquée lentement dans la veine marginale de l'oreille du lapin. A l'heure déterminée, l'animal est sacrifié par un coup sur la nuque, et autopsié immédiatement.

8) *Prélèvements :*

Le sang du cœur est prélevé aussitôt à l'aide d'une pipette Pasteur rincée à l'héparine, par ponction de l'un ou l'autre ventricule. Dans nos dernières expériences, nous y avons joint un prélèvement dans la veine cave inférieure.

Ce sang est recueilli dans un tube contenant 2 gouttes d'héparine pour 3 cm³ de sang. Les poumons, le foie et les reins sont recueillis dans des coupelles tarées.

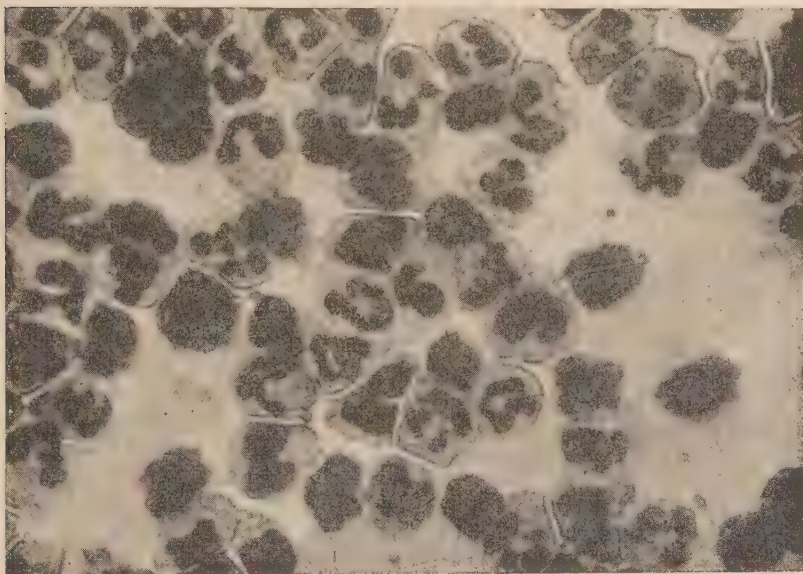


FIG. 3: Aspect de leucocytes séparés par la présente méthode

On prélève systématiquement, avec une paire de ciseaux fins, sur chaque poumon, un fragment para-hilaire et un fragment apical. Deux prélèvements sont réalisés pour le foie, tandis qu'une section mince des reins perpendiculaire à leur grand axe fournit deux échantillons représentatifs de l'ensemble. Ces deux opérations sont réalisées à l'aide de lames de rasoir.

Il est important, dans ces manœuvres, de ne pas pratiquer une expression des fragments.

Par ailleurs, la rate est disséquée et coupée en deux fragments. La moelle osseuse est prélevée dans les diaphyses fémorales. Chacun de ces échantillons est introduit dans un tube de pyrex, à collerette, préalablement taré, puis pesé immédiatement pour réduire les possibilités d'évaporation. Les échantillons sont ensuite recouverts de 1 cm³ d'acide nitrique concentré et laissés au repos vingt-quatre heures.

La digestion des organes représente un temps important de notre travail et elle nous a paru nécessaire pour permettre une plus grande uniformité dans la mesure au compteur à scintillations. Cette digestion amorcée à froid est poursuivie dans un bain-marie que l'on porte aux environs de + 50° C, sous une hotte de chimie. Elle fait l'objet d'une surveillance constante et l'on agite avec une fine baguette de verre, en ajoutant de l'acide nitrique jusqu'à digestion complète. On agira sagement en introduisant quelques gouttes d'une solution antimousse (solution antimoussante A de Saint-Gobain).

Les organes étant parfaitement dissous, on complète le volume à 3 ml et on coiffe les tubes à collerette à l'aide d'un bouchon-tulipe renversé. Il a paru intéressant dans les dernières expériences, d'interposer entre la solution acide et le bouchon une couche de paraffine qui se solidifie à la température du laboratoire.

9) Mesures des activités :

Les expériences préliminaires avaient comporté des mesures à l'aide d'un compteur de Geiger-Muller pour rayons β . Mais un rendement très supérieur est obtenu à l'aide d'un compteur à scintillations type Superscaler que nous avons utilisé constamment depuis deux ans.

La mesure portait sur des tubes à collerette d'un modèle soigneusement calibré, qui ont été remplis, tantôt à 4 ml tantôt à 3 ml ; de toute façon, le volume était identique pour les différents échantillons d'une même expérience.

10) Contrôle :

Par mesure de contrôle, nous entendons la mesure :

- d'une dilution au 1/1.000^e de la solution marquante ;
- d'une dilution au 1/100^e de la suspension leucocytaire ;
- et de dilutions des surnageants (par exemple 1/200^e, 1/50^e et 1/20^e pour tenir compte des différences d'activité).

Pour chaque mesure, nous avons exigé au minimum une activité de 1.000 impulsions, ce qui imposait parfois de prolonger la mesure jusqu'à trois ou dix minutes.

Le mouvement propre de notre compteur (mesuré sur dix minutes) a été très régulièrement voisin de 210 coups/minute.

11) *Mode d'expression des résultats :*

Après de nombreuses expériences, un modèle de feuille a été adopté, qui contient pour chaque animal l'ensemble des opérations effectuées.

Dans une double page, nous avons fait figurer successivement les colonnes suivantes (rassemblées ici sur un seul feuillet : *tableau I*) :

1° *Numéro de l'échantillon pour chacun des prélèvements :*

- le premier chiffre correspond à l'animal ;
- le second chiffre à l'organe prélevé, avec des lettres reproduisant l'ordre des échantillons.

2° *Nature du prélèvement :*

- Sang du cœur, sang de la veine cave, poumon droit, etc.

3° *Poids de l'organe entier :*

- Trois colonnes pour tare, poids brut et poids net.

En ce qui concerne le poids total du sang, nous avons adopté les chiffres donnés par BURKE pour le lapin [19], soit $1/18^e$ du poids du corps.

Pour la moelle, nous avons estimé ce poids au $1/45^e$ du poids du corps.

4° *Valeur mesurée :*

- C'est le nombre de coups/minute enregistré par le compteur sur l'échantillon prélevé.

5° *Activité brute :*

- C'est l'activité précédente, corrigée du mouvement propre du compteur.

6° *Activité corrigée :*

— La diminution de la radioactivité de l'élément Cr^{51} nécessite déjà une correction importante si les mesures sont faites à plusieurs jours d'intervalle.

Le facteur de correction à introduire est fourni par des tables ou des abaques.

7° *Poids de l'échantillon prélevé :*

- Trois colonnes pour tare, poids brut et poids net.

8° *Activité ramenée au gramme d'organe.*

9° *Coefficient d'absorption différentiel ou C.A.D. :*

(Synonyme de D.A.R. ou « differential absorption rate » des auteurs anglo-saxons.)

A reçu 7,1 g de suspension leucocytaire marquée, soit $7,1 \times 41.300 = 303.000$ c/mm, et par g d'animal : 123 c/mm

1 N°	2 NATURE DU PRÉLÈVEMENT	3 POIDS DE L'ORGANE		4 VALEUR MESURÉE	5 ACTIVITÉ BRUTE	6 ACTIVITÉ CORRIGÉE	7 POIDS DE L'ÉCHANT.		8 ACTIVITÉ PAR GR.	9 C.A.D	10 ACTIVITÉ TOTALE	11 % DE LA R.A. TOTALE	
		Tare	brut net				Tare	brut net					
21	Sang du cœur	(1/18°)	136	1.514	— 300	1.214	6.605	2.7	3.9	310	2.5	42.000	14 %
22 a	Poumon droit	18	11,25	6,75		10.418	1.707	0,970	0,737	14.600	17.290	117.000	39 %
22 b	»		»	12.148		11.818	1.797	1,178	0,619	19.980			
22 c	Poumon gauche	18,05	13,04	5,01		9.206	1.719	1,116	0,603	15.300	15.000	75.000	25 %
22 d	»		»	8.834		8.534	1.901	1,317	0,582	14.700			
23 a	Foie	200	101	99		412	1.422	0,342	1,080	380	595	59.000	19,6 %
23 b	»		»	864		564	1.595	0,385	1,200	710			
24 a	Rate	(par addition)	0,794	445		145	1.563	1,133	0,430	336	317	245	0,08 %
24 b	»			408		108	1.877	1,513	0,364	298			
25 a	Reins	18,02	3,68	14,34		530	1.303	0,547	0,756	700	765	1.460	0,48 %
25 b	»			755		455	1.595	1,043	0,552	830			
26 a	Moelle osseuse	(1/45°)	54	317		17	1.310	1,083	0,227	76	104	5.540	1,85 %
26 b	»			340		40	1.599	1,298	0,301	132			
												320.245	102 %

— Il se définit comme le rapport de l'activité par gramme d'organe à l'activité injectée pour un gramme de l'animal (activité totale injectée, divisée par le poids de l'animal).

Ce mode d'expression apparaît préférable à l'expression du rapport : activité par gramme d'organe/activité par gramme de sang — convention qui avait été adoptée au début de ces expériences. En effet, l'activité du sang constitue elle-même une variable soumise à de nombreux facteurs d'erreur.

10° *Activité totale fixée par organe (ou tissu).*

11° *Pourcentage de la radioactivité de chaque organe ou tissu par rapport à la quantité totale injectée.*

* *

En haut de chaque feuille figurent l'identité de l'animal (numéro, poids), la préparation qu'il a subie s'il y a lieu (immunisation par exemple), la quantité de suspension globulaire injectée, l'activité totale correspondante et par gramme d'organe.

D'autre part, nous avons jugé utile de présenter une feuille pour les contrôles.

Mode d'expression : finalement les résultats se définissent par les deux valeurs :

1° coefficient d'absorption différentiel (C.A.D.);

2° pourcentage de radioactivité totale.

Ces valeurs sont récapitulées pour chaque animal.

Un dossier d'expérience complet, comportant des injections à l'animal, comprend :

1° *Le projet* (aussi détaillé que possible, notamment en ce qui concerne le matériel à prévoir, pour réduire au minimum la part de l'improvisation).

2° *Les notes* prises au cours d'expérience (pesées, horaires, etc.), protocole d'exécution.

3° *Les contrôles hématologiques* (numération, frottis colorés).

4° *Les feuilles de mesure* qui constituent les pièces essentielles du dossier :

- une feuille pour les contrôles ;
- une feuille pour chaque animal.

5° *La récapitulation* avec un protocole final.

C) MARQUAGE « in vitro » DE LEUCOCYTES HUMAINS PAR L'Au¹⁹⁸ COLLOÏDAL

Le marquage des leucocytes par l'or colloïdal nous a été suggéré par A. LOVERDO qui cherchait la raison de la disparition dans le foie de l'or colloïdal injecté dans la circulation. Cette disparition est-elle liée à une action propre des cellules hépatiques elles-mêmes ou à une action des leucocytes présents dans les vaisseaux du foie ?

Dans un premier temps, A. LOVERDO pensait réaliser un marquage sélectif des leucocytes en ajoutant au sang entier la solution marquante d'or colloïdal. Cette hypothèse de travail a été vérifiée dans trois opérations que nous exposerons plus loin avec les contrôles d'efficacité (opérations Klondyke I, II, III).

Mais un rendement plus sûr nous a été donné par le marquage direct « in vitro » de leucocytes déjà séparés, dans les mêmes conditions que le marquage par le P³² ou le Cr⁵¹.

Voici un protocole type d'une expérience de marquage par l'Au¹⁹⁸ colloïdal de leucocytes humains séparés.

1) Récolte de leucocytes :

On pratique comme pour le marquage par le Cr⁵¹.

2) Solution marquante :

Le radio-or colloïdal est fourni par le Commissariat à l'Energie Atomique. Ce colloïde est caractérisé par la composition chimique suivante :

— or	3,5 mg/ml
— gélatine	30 mg/ml
— glucose	1 mg/ml
— NaCl	5 mg/ml

La taille moyenne des particules est de 300 Å (angströms); le pH est de 5,5.

L'activité par millilitre est de 5 à 15 millicuries.

Rappelons que l'Au¹⁹⁸ a une période de 2,69 jours et qu'il émet une série de rayons β et γ d'énergie différente.

La suspension colloïdale stérile est livrée en flacons sertis, type pénicilline. À l'état concentré, elle présente une teinte brun rouge foncé, qui se transforme en une teinte délicatement rosée par dilution.

Nous avons utilisé des doses d'un millicurie, le plus souvent sous un volume de 10 ml. À titre d'indication, un microcurie d'Au¹⁹⁸ sous un volume de 3 ml donnerait à notre compteur à scintillations 2.10^6

impulsions par minute. On voit que la sensibilité du comptage est considérable : pour une activité égale en microcuries, elle est environ 30 fois supérieure à celle du Cr^{51} .

3) *Choix du délai et des doses optima de marquage :*

Des expériences préliminaires ont fixé le délai à soixante minutes (incubation à $+ 37^\circ \text{C}$) et la dose à 50 ou 100 microcuries.

4) *Marquage :*

La crème leucocytaire qui représente un volume de 10 à 15 ml a été recueillie dans un tube à centrifuger de 100 ml siliconé. On ajoute la solution marquante et on porte le tube au bain-marie où il séjournera pendant une heure, avec une agitation toutes les sept minutes.

5) *Lavage :*

Les trois lavages par centrifugation brève sont effectués dans les mêmes conditions que pour le marquage au Cr^{51} . Le premier surnageant est franchement rose. On met de côté pour la mesure, comme précédemment, les trois surnageants.

6) *La suite des opérations :*

Est exactement superposable à celle que nous avons décrite pour le chrome. Une attention particulière est apportée à l'horaire des mesures en raison de la brièveté de la période de l'or colloïdal.

III. — CRITIQUE DE CES TECHNIQUES

L'étude critique que nous avons nous-mêmes effectuée a porté sur les deux points suivants :

- efficacité du marquage ;
- stabilité de ce marquage.

Dans le cas particulier du phosphore, une analyse a été effectuée pour préciser le compartiment dans lequel s'effectuait l'incorporation du radioisotope.

A) MARQUAGE PAR LE P^{32}

Dans nos conditions habituelles de marquage, nous retrouvons sur le culot leucocytaire, après deux centrifugations-lavage, 6 à 15 % de l'activité mise au contact. En ce qui concerne la stabilité, nous

n'avons pas appliqué au P^{32} les protocoles précis que nous exposerons pour les autres radioisotopes ; nous avons seulement une impression qui est celle d'une faible stabilité du marquage par le P^{32} « in vitro » dans nos conditions d'expériences.

MAUPIN et coll. [67] ont réalisé à quatre reprises un fractionnement chimique des leucocytes marqués, selon la méthode de SCHNEIDER [102].

On sait que cette méthode permet de séparer dans l'ordre, le phosphore acido-soluble, le phosphore lipidique, le phosphore nucléique et le phosphore protéique d'un tissu organique.

La comparaison de la radioactivité du produit entier, avec la somme des radioactivités de chacune des fractions, affectées de leur coefficient, permettait un recoupement précieux.

Trois essais ont été réalisés à l'aide d'un compteur à liquide et nous ont donné des résultats satisfaisants. Le phosphore étant dosé par colorimétrie (méthode de MACHEBŒUF et DELSAL), il était possible de déterminer l'activité spécifique de chaque fraction phosphorée.

Voici les résultats (en coups/minute par microgramme de phosphore) :

	FRACTION PHOSPHORÉE			
	<i>acido-soluble</i>	<i>lipidique</i>	<i>nucléique</i>	<i>protidique</i>
Exp. S	10.600	1.600	200	important
Exp. T	15.600	280	220	1.140
Exp. AA ...	1.000	27	10	60

Il apparaît donc que l'activité spécifique est surtout localisée, pour 96 %, dans la fraction acido-soluble, tandis que la fraction lipidique, dans une expérience, et la fraction protéique, dans deux expériences, ont une activité significative.

Mais il n'y a pratiquement pas d'incorporation dans la fraction nucléique des leucocytes après un délai d'incubation de deux heures à $+ 37^{\circ} \text{C}$.

Après dix-neuf heures de fixation à $+ 37^{\circ} \text{C}$, cette répartition n'est pas modifiée mais le rendement total est diminué.

De ces constatations, se dégage une conclusion pratique qui est d'utiliser les leucocytes marqués par le P^{32} le plus rapidement possible et de ne tirer de conclusion que des expériences de courte durée.

B) MARQUAGE PAR LE Cr^{51}

1) *Efficacité* :

Elle a été étudiée spécialement dans deux expériences (opérations « Kroumir » et « Bain-Marie »). Ces opérations comportaient la mise en contact de quatre fractions de la même récolte leucocytaire avec 100 μC de radiochromate. Le volume total était de 2 ml et l'incubation a été effectuée dans un tube de Vernes siliconé, au bain-marie à $+37^\circ\text{C}$ pendant des délais fixés respectivement à cinq, dix, trente et soixante minutes. Après l'incubation, le culot leucocytaire a été séparé par deux centrifugations brèves. Les activités des culots et des surnageants étaient mesurés dans un compteur de Geiger-Muller à liquide. L'efficacité atteignait 46 % après cinq minutes, 39,5 % après dix minutes, 38 % après trente minutes, et 29 % après soixante minutes. Mais il s'agissait ici d'une expérience préliminaire.

Dans l'expérience « Bain-Marie », 7,1 grammes de crème leucocytaire sont additionnés de 1 ml de la solution marquante (900 μC par ml) et de 10 ml d'eau physiologique pour faciliter la répartition. On répartit dans des tubes 4 fois 4,5 ml qui sont mis en incubation à $+37^\circ\text{C}$ au bain-marie pendant cinq, dix et soixante minutes ; le deuxième tube a été additionné d'acide ascorbique (200 u.i.) pour étudier l'effet de la réduction chimique sur le marquage à l'issue d'une incubation de cinq minutes.

Le tableau suivant indique les résultats obtenus en pourcentage de l'activité présentée :

	1 ^e surn.	2 ^e surn.	3 ^e surn.	Fixé sur G.B.	Surnageant après 3 h
Incubation 5 mn	55,6	16,6	9,9	17,8	2,5
Incubation 5 mn + ac. ascorbique	70,8	11,6	5	11,2	1
Incubation 10 mn	44,6	28	9,35	17,8	1,9
Incubation 60 mn	39,8	27,5	10,7	21,3	3

Le troisième surnageant possède encore une activité importante mais la validité des trois premières centrifugations est démontrée par le fait qu'un lavage effectué trois heures après, n'extrait plus qu'une activité réduite.

Par ailleurs, le rendement du marquage, si l'on ajoute de l'acide ascorbique, est sensiblement diminué des $2/5^e$, ce qui prouve l'intervention de facteurs chimiques dans la fixation du radiochromate.

2) Stabilité :

Des contrôles ont été opérés à l'occasion de plusieurs expériences, mais nous donnerons les résultats de l'opération « Bain-Marie » qui a été spécialement montée pour l'étude de la stabilité. Les tubes sont laissés à la température du laboratoire pendant vingt-quatre heures et le culot leucocytaire lavé de nouveau. L'activité restante est la suivante :

	Par rapport à l'activité initiale du culot	Par rapport à l'activité totale utilisée au départ
Incubation 5 mn	52,4 %	9,3 %
Incubation 5 mn + acide ascorbique	42,8 %	4,8 %
Incubation 10 mn	55,5 %	9,9 %
Incubation 60 mn	54,3 %	11,6 %

Ainsi, environ 50 % de l'activité initiale du culot restent encore fixés sur les globules blancs après vingt-quatre heures.

Ce délai de vingt-quatre heures représente donc un délai maximum pour la validité du marquage.

C) MARQUAGE PAR L'OR COLLOÏDAL RADIOACTIF

1) Efficacité du marquage dans le sang total :

Trois expériences (Klondyke I, II et III) visaient à obtenir un marquage sélectif des leucocytes, à partir de la solution colloïdale d'Au¹⁹⁸ ajoutée au sang total, en opérant pendant vingt-quatre à quarante-huit heures.

— *Klondyke I* : sang humain recueilli sur une solution A.C.D. (solution anticoagulante à base de citrate de soude, acide citrique et dextrose) à raison de 350 ml de sang pour 100 ml d'A.C.D. On ajoute aussitôt, aseptiquement, 3 ml de solution marquante, représentant au total 55.000 coups/minute.

Après vingt-cinq heures à la température du laboratoire, on sépare par sédimentation une couche leucocytaire, dont l'activité totale correspond à 0,55 % de l'activité initiale.

Un culot globulaire rouge a fixé 12,2 % mais on pense qu'il a conservé une fraction importante des leucocytes.

— *Klondyke II* : à 450 ml de sang humain recueilli sur A.C.D., on ajoute 10 ml de solution marquante, soit 446.880 coups/minute.

Après quarante-huit heures, une centrifugation différentielle permet de séparer :

— le plasma	86 % de l'activité totale
— les globules rouges (non lavés) ..	13 % de l'activité totale
— une partie des globules blancs	
(150 millions)	0,55 % de l'activité totale
— et une partie des plaquettes	
(48 milliards)	0,5 % de l'activité totale

Mais la numération nous indiquait, au départ : 2.600.000.000 globules blancs. Nous avons donc recueilli seulement 5,85 % des globules blancs présents initialement, qui ont été soumis à la mesure sous le nom de « culot leucocytaire ». S'il nous était permis d'extrapoler, l'activité de la somme des globules blancs serait théoriquement de :

$$0,55 \times \frac{2,6 \cdot 10^9}{150 \cdot 10^6} = 9,5 \%$$

Elle expliquerait en partie l'activité du culot globulaire rouge non lavé.

— *Klondyke III* : sang humain frais hépariné (360 ml); on ajoute à ce sang qui n'a pas été dilué, 3.300.000 coups/minute d'or colloïdal Au¹⁹⁸.

Après vingt-quatre heures, on sépare :

— Le plasma	2.600.000 c/mn
— Le culot globulaire brut	600.000 »
— Un tapis leucocyto-plaquettaire (buffy-coat) ..	66.750 »
— Un échantillon pur de globules blancs ...	18.550 »
<i>Total</i>	3.285.300 c/mn

Le lavage du culot globulaire brut, suivi de la mesure de l'activité des fractions, permet d'attribuer au plasma résiduel 400.000 c/mn

et aux seuls globules rouges lavés, 6.000 c/mn. Les globules blancs de ce culot seraient donc responsables de 194.000 c/mn.

D'autre part, on a mesuré l'activité d'un échantillon leucocytaire pur, correspondant à 540.10^9 globules blancs alors que le chiffre des globules blancs atteignait au départ $2,6.10^9/\text{mm}^3$.

On admet une efficacité de 1,6 % pour les leucocytes soumis à la mesure, cette efficacité atteindrait 7,6 % s'il était permis d'extrapoler au chiffre total des globules blancs.

Dans les mêmes conditions, les plaquettes ont fixé de 0,05 % (échantillon mesuré) à 2 % (par extrapolation à l'ensemble des plaquettes initialement présentes). L'activité fixée sur les globules rouges est négligeable (0,2 %).

En conclusion de ces trois essais, il est permis d'écrire que les leucocytes d'un sang citraté-acide-glucosé, ou d'un sang hépariné, fixent en vingt-quatre à quarante-huit heures, à la température du laboratoire, une fraction significative de l'activité ajoutée sous forme d'or colloïdal radioactif.

Nous pouvons donc conclure, jusqu'à un certain point, à une *fixation sélective* de l' Au^{198} colloïdal sur les leucocytes, de préférence aux autres éléments figurés du sang.

Mais cette fixation a peut-être plus d'intérêt théorique que pratique, car il est très difficile de séparer ensuite, à partir du sang total, les leucocytes marqués.

2) Efficacité du marquage des leucocytes séparés :

— *Expérience « Lorelei »* : 17,8 grammes de crème leucocytaire sont reçus sur 55,4 ml de solution marquante (2.270.000 coups minute) et répartis dans 3 pots de 100 ml siliconés, qui sont portés au bain-marie à $+37^\circ\text{C}$ (après vingt-trois minutes à la température du laboratoire) :

- le premier : incubation 10 mn
- le second : incubation 20 mn
- le troisième : incubation 60 mn

L'efficacité est mesurée par l'activité qui reste fixée sur les globules blancs, après deux lavages :

- incubation 10 mn : 1,7 %
- incubation 20 mn : 1,5 %
- incubation 60 mn : 4,4 %

— *Expériences Noces d'Or* : 10 grammes de globules blancs provenant d'un sang citraté de vingt-quatre heures sont reçus sur une solution marquante d'or colloïdal, diluée, et qui possède encore une activité de 50 μC (100.000.000 coups/minute) sous un volume de 10 ml et mis en incubation à $+ 37^{\circ}\text{C}$ pendant une heure.

Après trois lavages, les leucocytes conservent encore 10,7 % de l'activité initiale.

— *Expérience No-Bis* : la même solution que précédemment a été utilisée pour mesure d'efficacité, plusieurs jours après, la radio-activité de la solution marquante ne représentant plus que 13,6 μC . Le rendement tombe cette fois à 1,84 % après une incubation d'une heure à $+ 37^{\circ}\text{C}$, et trois lavages.

— *Expérience Trésor* : à 4,8 grammes de crème leucocytaire, on ajoute 1 ml de la solution marquante (48 μC par ml). Après incubation d'une heure à $+ 37^{\circ}\text{C}$ et trois lavages, le rendement est de 1,58 %.

— *Expérience Jordanie* : 13,80 grammes de crème leucocytaire sont marqués par 800 μC dans un volume de 50 ml. Après une heure, 9,25 % restent fixés, et après deux heures, 8,8 %.

3) Stabilité :

Nous l'avons spécialement étudiée dans l'opération Trésor qui comportait l'inclusion d'un sac de cellophane contenant les leucocytes marqués, dans le péritoine du lapin.

A 4.8 grammes de crème leucocytaire, on incorpore 1 ml de la solution marquante d'or colloïdal (48 microcuries par ml). Après incubation d'une heure à $+ 37^{\circ}\text{C}$ au bain-marie et trois lavages, on obtient 1,17 grammes de crème leucocytaire marquée, auquel on ajoute de l'eau physiologique pour amener le volume à 16 ml. Dans deux sacs de cellophane, on introduit 5 ml de la préparation marquée et 0,25 ml d'un mélange d'antibiotiques (10.000 unités de pénicilline, 50 mg de streptomycine par ml). Ces sacs sont introduits dans le péritoine du lapin, et arrosés, ainsi que la plaie opératoire, d'une quantité importante de la même solution d'antibiotiques.

Dans un flacon d'eau physiologique est disposé un troisième sac de cellophane contenant 4 ml de la suspension leucocytaire. On porte la préparation à l'étuve à 37°C .

— *Séjour de vingt-quatre heures « in vivo »* :

On fait un prélèvement de sang dans la veine de l'oreille du premier lapin au bout de vingt-quatre heures, puis on retire le sac de

cellophane dont le contenu (1,2 ml) est recueilli, additionné de 10 ml d'eau physiologique et centrifugé dix minutes au troisième plot de la centrifugeuse Jouan. Le surnageant est séparé par décantation. L'activité incluse était primitivement de 94.500 coups/minute.

La répartition de l'activité au bout de vingt-quatre s'effectue comme suit :

	Coups/minute	% R.A.
Sang périphérique (1/18 ^e du poids du corps)	268	négligeable
Leucocytes dans un volume de 1,2 ml (culot surnageant)	32.600	35
	3.180	3,4
Résidu du sac (totalité)	57.000	61,3
<i>Total :</i>	93.048	

— *Séjour de quarante-huit heures « in vivo » :*

Le sang n'a pas pu être prélevé dans la veine de l'oreille et l'on a mesuré l'activité du sang du cœur après sacrifice de l'animal. L'activité incluse était également ici de 94.500 coups/minute, et l'on obtient :

	Coups/minute	% R.A.
Sang du cœur (ramené au volume total du sang de l'animal)	345	négligeable
Leucocytes dans un volume de 0,7. ml (culot surnageant)	38.500	39,3
	1.100	1,1
Résidu du sac (totalité)	58.200	59,5
<i>Total :</i>	98.145	

— *Essai de dialyse de vingt-quatre heures « in vitro » :*

L'activité incluse était de 75.700 coups/minute. Après vingt-quatre heures à l'étuve à + 37° C, on obtient (pourcentages exprimés par rapport à la somme des activités partielles mesurées) :

	Coups/minute	% R.A.
Liquide dialyseur	2.800	3,5
Leucocytes dans un volume de 4,5 ml (culot surnageant)	70.000	87,5
"	2.100	2,6
Résidu du sac (totalité)	5.150	6,4
<i>Total :</i>	80.050	

C'est intentionnellement que nous avons omis d'inclure dans un péritoine de lapin un sac de cellophane contenant une dose connue de solution marquante, puisque l'or colloïdal par sa nature ne se prête pas à la dialyse.

Cependant nous avons été surpris de constater que dans l'expérience « in vitro », 3,5 % de l'activité avait diffusé au travers des parois de cellophane.

— Conclusions :

Les principales difficultés d'interprétation viennent :

- a) de l'importance de la perte sur les parois du sac (qui sont mouillables) et de la réduction du volume de son contenu ;
- b) de l'absence de dialyse de l'or colloïdal libre (dialyse négligeable), et de ce fait les leucocytes restent en présence d'une forte concentration de l'isotope radioactif.

Après vingt-quatre heures de dialyse « in vitro », les leucocytes conservent 87,5 % au minimum, tandis qu'« in vivo », ils conservent 35 % après vingt-quatre heures et 39 % après quarante-huit heures, proportion qui doit être majorée d'une valeur importante en raison de la perte sur les parois du sac.

IV. — CAUSES D'ERREUR

Nous passerons rapidement en revue les causes d'erreur qui se présentent dans l'ensemble de nos opérations, en indiquant les précautions prises :

A) ERREURS SUR LES PRÉLÈVEMENTS DE CONTROLE

1° Défaut de précision ou mauvais usage des pipettes graduées : c'est une question d'attention.

2° Adsorption par la surface : elle joue surtout pour P^{22} et Au^{198} comme nous avons eu l'occasion de le vérifier.

Nous avons respecté, en ce qui concerne les produits marqués par le P^{32} , la précaution classique qui consiste à rincer les pipettes, avant tout prélèvement, par une solution de phosphate disodique à 0,5 % (à titre d'entraîneur).

Le siliconage des pipettes par un chlorsilane (Rhodorsil 240) évite les pertes sur les parois : ce procédé recommandable n'a pas été utilisé systématiquement.

3° Erreur sur l'échantillon : un défaut d'homogénéité dans les suspensions d'éléments figurés peut faire que l'échantillon prélevé ne soit pas représentatif. L'existence d'agglutinats est à ce point de vue très préjudiciable, surtout lorsque la dilution en vue de la mesure d'activité est importante. La plupart de nos échantillons étaient dilués au 1/100^e.

En vue d'obtenir une homogénéité aussi parfaite que possible, les éléments figurés ont été remis en suspension dans une solution de séquestrène (choix préférable à celui d'une simple solution chlorurée isotonique et surtout d'eau distillée). Les culots de lavages, lorsqu'ils existent, sont agités avec des billes de verre et un faible volume de solution jusqu'à opalescence uniforme.

Il nous a paru important de procéder aux dilutions et à la répartition des échantillons de mesure, le jour même du marquage, pour éviter la sédimentation des éléments figurés.

(Dans de rares cas, certains échantillons de culots leucocytaires ont été dissous dans une lessive de soude.)

B) ERREURS D'APPRÉCIATION DANS LES QUANTITÉS INJECTÉES

Il importe de ne pas se fier à la graduation d'une seringue ou d'un flacon, mais de tarer exactement la seringue (ou le flacon) avant et après injection. Néanmoins, quand il persiste des erreurs, elles paraissent imputables :

1° A la pesée.

2° Au défaut d'homogénéité du produit injecté (perte sur les parois ou agglutinats dans l'espace nuisible de la seringue).

3° A des incidents mécaniques (aiguille sortie de la veine), fuite à l'embout ou par le haut du piston (si la seringue n'est pas étanche).

C) PRÉLÈVEMENT DES ORGANES (OU TISSUS) ET DES ÉCHANTILLONS D'ORGANES

1° Contamination par les instruments de dissection, par le sang extravasé, etc., évitée par un travail propre.

2° Etat de congestion ou de déplétion de l'organe, parasitose, etc., : tout aspect anormal est noté sur le protocole.

3° Erreurs de pesée : nous pensons surtout à la *perte d'eau par évaporation*, qui n'est pas négligeable lorsque la température ambiante est élevée et que l'échantillon a été coupé en tranches minces. Il en résulte une erreur par excès, la valeur mesurée étant rapportée à un poids d'échantillon inférieur au poids réel.

Cette erreur est évitée si la pesée suit immédiatement le prélèvement de l'échantillon. Mais il faut que la balance sensible se trouve dans la pièce même où l'on opère, ou dans un local très voisin, et que le personnel chargé de la pesée suive la cadence des prélèvements.

On pourrait recouvrir de Parafilm, soigneusement appliqué, l'échantillon que l'on vient de découper, à condition de peser le tube de mesure avec sa coiffe de Parafilm. Nous n'avons pas jugé cette précaution indispensable.

4° Différence de répartition dans les organes (lapin) :

Cette cause d'erreur est finalement la seule contre laquelle on ne puisse agir efficacement, à moins de soumettre à la mesure l'organe entier. Alors que pour le foie et les reins l'activité a toujours paru homogène, le poumon nous a fréquemment fourni des résultats très discordants suivant les échantillons (variant par exemple de 1 à 10 et parfois plus).

Ceci est dû très probablement à la constitution par les éléments figurés de thrombus ou embols qui se répartissent capricieusement dans n'importe quel territoire vasculaire. Pour cette raison, nous avons prélevé systématiquement deux échantillons du poumon droit et deux échantillons du poumon gauche, pour chaque animal. Cette précaution n'évite pas absolument la cause d'erreur.

La rate est toujours prélevée en deux fragments qui sont mesurés séparément : la mesure porte ainsi sur l'organe entier.

Le sang prélevé dans les cavités cardiaques peut être chargé de micro-caillots renfermant des plaquettes. Nous considérerons les prélèvements de sang sur le cadavre comme non homogènes et difficilement comparables.

D) OPÉRATIONS DE CALCINATION OU DE DIGESTION

1) *Calcination* (marquage par P^{32}) :

— *Moussage* : projections de fragments de l'échantillon entraînant une erreur par défaut.

La déshydratation doit être progressive, et la calcination proprement dite sera précédée d'un séjour d'une nuit, au four ($+ 110^{\circ} \text{C}$), après addition de quelques gouttes d'une solution d'acétate de magnésium.

Au cours de la calcination dans le four à moufle, un « palier » de dix à vingt minutes sera ménagé vers $+ 200^{\circ} \text{C}$.

— *Fumées* : nous avons vérifié l'absence d'entraînement, par les fumées, de particules radioactives de la manière suivante : la fumée était aspirée au travers d'un vase barboteur, dont le contenu était ensuite analysé au compteur. L'activité du liquide de barbotage était nulle (égale au « bruit de fond »).

2) *Digestion* :

Dans la plupart des cas de marquage par le Cr^{51} ou Au^{198} , les échantillons étaient digérés par l'acide nitrique pur (fumant ou non), à froid d'abord, ensuite au bain-marie à $+ 60^{\circ} \text{C}$.

Les causes d'erreur peuvent résulter :

- d'une digestion insuffisante ou de l'absence d'émulsion des lipides (défaut d'homogénéité);
- du moussage (combattu efficacement par addition de traces d'un antimousse Saint-Gobain ou Bayer);
- de la perte sur les baguettes de verre effilé servant à l'agitation ;
- de la perte sur les parties supérieures du tube (qui échappe à la mesure);
- du bouchage : fuite au travers d'un bouchon défectueux, ou entre le bouchon et la paroi du tube.

Il faudra procéder très soigneusement à cette digestion acide, qui représente certainement l'opération la plus fastidieuse, sinon la plus désagréable, en raison des vapeurs nitriques et des risques de brûlure chimique des doigts ou des vêtements. Le bouchage est pratiqué autant que possible peu de temps avant la mesure, pour éviter l'attaque du bouchon-tulipe par l'acide.

Dans nos dernières expériences, il a paru intéressant de verser sur l'échantillon qui a été digéré (volume ramené à 3 ml) une couche épaisse de paraffine fondue : celle-ci, en se solidifiant, isole le bou-

chon et permet de retourner le tube sans disperser l'activité sur la collerette. Mais elle n'évite pas absolument l'ascension d'acide entre le cylindre de paraffine et les parois du tube, par capillarité.

Finalement, l'erreur sur l'échantillon soumis à la digestion nitrique paraît peu importante.

E) ERREURS DE MESURE

Elles peuvent tenir :

- au compteur lui-même : l'appareil le plus perfectionné n'est pas exempt de panne. Par exemple, notre totalisateur, pendant un temps, « n'accrochait » pas tous les chiffres « mille » : une surveillance s'impose, et la réparation est facile ;
- à un bruit de fond ou mouvement propre excessif, qui signifie une contamination, fréquente avec des tubes non hermétiquement bouchés. Pour l'éviter, certaines précautions sont nécessaires : vérifier le bouchon, retourner le tube avant de l'introduire dans le compteur, et à distance de celui-ci, en préparant un papier-filtre ou un coton pour recueillir le liquide perdu.

Lorsque la mesure est faite sur échantillons solides, calcinés, il arrive que la poudre soit attirée par la fenêtre de mica du compteur de Geiger-Muller, si celle-ci n'est pas munie d'une grille anti-magnétique.

La mesure par tube de Geiger sur échantillons liquides, impose un rinçage minutieux du tube et une nouvelle détermination du mouvement propre après chaque essai ;

- à des activités trop fortes, saturant le compteur de Geiger-Muller ;
 - à des activités trop faibles, se situant à la limite du « mouvement propre » du compteur ;
 - à un défaut de géométrie : coupelle de quartz ovalisée (compteur G.M.) ou tube de calibre inégal (cristal creux), sédimentation dans les tubes contenant les échantillons digérés.
- Bien entendu, les échantillons mesurés au cristal creux auront le même volume que les échantillons de contrôle pour une série donnée.
-

CHAPITRE III

RESULTATS

Toutes nos expériences ont été effectuées par injection intra-veineuse. Le délai de sacrifice était de vingt minutes et avait essentiellement pour but de préciser les lieux de fixation des leucocytes transfusés, dans les conditions normales ou modifiées par divers facteurs. Il serait intéressant, par la suite, de prolonger la durée des expériences afin de préciser le devenir lointain des leucocytes fixés dans certains organes, essentiellement dans le poumon, ainsi que chez les animaux immunisés. L'efficacité et la stabilité du marquage par le chrome 51 et surtout l'or 198 colloïdal permettent d'envisager ces expériences.

I. — TRANSFUSION A L'HOMME DE LEUCOCYTES MARQUÉS

Nous n'avons pas participé à ces expériences qui ont été réalisées à l'aide du P³² [50 - 51 - 67]. Elles ont leur place ici car elles rentrent dans les conditions de notre exposé.

Certaines précautions ont été prises en vue des injections à l'homme :

- utilisation du sang de sujets normaux et de même groupe sanguin ;
- utilisation, pour la dilution de la suspension leucocytaire, d'une solution physiologique apyrogène ;
- contrôle de stérilité (ensemencement sur milieu à l'hydrosulfite).

Finalement, la crème leucocytaire diluée dans un volume de 100 ml peut être injectée.

1) Une transfusion de 9,6 milliards de globules blancs pour une radioactivité de 99 millions de coups/minute a été réalisée chez un malade atteint de leucémie lymphoïde chronique. A titre de comparaison, une injection de radiophosphore (59.400.000 coups/minute) à

l'état inorganique a été pratiquée le 17 septembre 1957 chez un malade atteint de leucémie myéloïde chronique. Le radiophosphore disparaissait plus rapidement de la circulation lorsqu'il était lié aux leucocytes que lorsqu'il était injecté à l'état de solution inorganique.

2) Une expérience effectuée dans le Service de Monsieur le Professeur GOSSET, le 20 mars 1952, associait une transfusion de leucocytes marqués à une pneumonectomie, chez un malade de cinquante-quatre ans, atteint d'une tumeur épidermoïde du poumon droit. En cours d'intervention, le malade maintenu en hypotension contrôlée, reçoit 80 ml d'une suspension riche de 86.000 leucocytes au millimètre cube, avec une activité totale de 21.280.000 coups/minute (environ 0,2 mC).

On prélève vingt-quatre minutes après la transfusion, qui a duré huit minutes, deux fragments de poumon normal, dont le C.A.D. est estimé à 6,1 après calcination ; trente-cinq minutes plus tard, soit une heure environ après la transfusion, la veine est clampée, puis le poumon droit enlevé en totalité ; un fragment prélevé en tissu normal présente un C.A.D. de 3,45, le tissu tumoral un C.A.D. de 2.

Le C.A.D. du sang au même moment est de 2 (3,8 aussitôt après la transfusion), tandis que celui du culot leucocytaire (0,19 aussitôt après transfusion) est tombé à 0,07.

3) Une autre expérience effectuée dans le service de chirurgie thoracique de l'hôpital militaire Percy, le 23 juin 1954, associait une transfusion de leucocytes marqués à une lobectomie, chez un malade de vingt et un ans qui présentait une cavité résiduelle post-tuberculeuse au voisinage du hile. En cours d'intervention, il a reçu 109 ml d'une suspension riche de 12.175 leucocytes par millimètre cube, avec une activité totale de 24.200.000 coups/minute. La veine pulmonaire correspondante au lobe enlevé a été clampée exactement vingt minutes après la fin, vingt-huit minutes après le début de la transfusion.

Le C.A.D. calculé sur une moyenne de trois fragments calcinés est de l'ordre de 13. Il est égal à 1 pour la paroi de la cavité et pour le sang prélevé au moment de l'exclusion.

II. — INJECTION A L'ANIMAL

A) AU LAPIN NORMAL

Cet animal a été choisi pour la facilité des injections dans la veine de l'oreille et afin de confronter les résultats avec ceux de WEISBERGER marquant les leucocytes « in vivo » [91 - 92 - 93].

Ces auteurs sacrifiaient leurs animaux trente à quarante-cinq minutes après l'injection. Nous avons respecté ce délai à l'origine, mais il nous a paru par la suite plus intéressant d'adopter un délai de vingt minutes : en effet, d'une part ce délai est suffisant pour nous assurer une répartition homogène du produit injecté dans la circulation de l'animal, d'autre part, il met mieux en évidence les phénomènes essentiels.

Nous examinerons les résultats séparément pour chacun des traceurs utilisés.

a) MARQUAGE PAR LE P^{32}

Dans les conditions définies précédemment, nous avons obtenu la répartition suivante au bout de vingt minutes, comparée avec les résultats d'une série d'injections de radiophosphore à l'état inorganique (*graphiques I et II*).

Voici les C.A.D. obtenus :

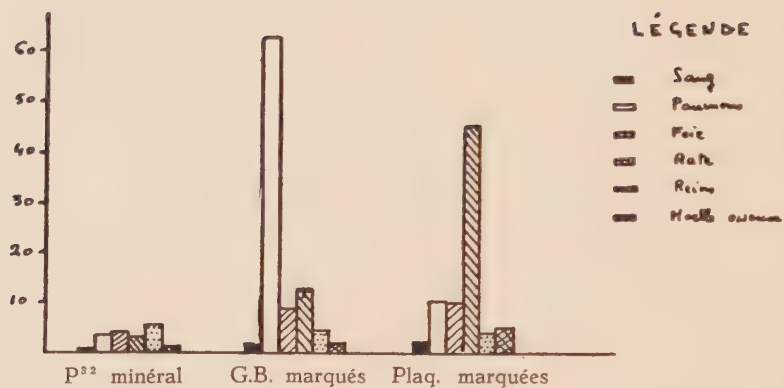
	Globules blancs marqués (moyenne sur 4 animaux)	P^{32} inorganique (moyenne sur 4 animaux)
Sang	1,6	0,9
Poumon	63	3,9
Foie	8,5	4,1
Rate	13	3,6
Rein	4,9	8,9
Moelle osseuse	2,1	1,8

Le rôle du poumon est nettement mis en évidence par un C.A.D. moyen de 63, ce qui signifie que la fixation des leucocytes radioactifs par gramme de poumon est 63 fois supérieure à la répartition supposée homogène du même produit par gramme d'animal. L'activité décroît dans l'ordre : rate, foie, reins, moelle osseuse, sang.

Ces résultats ne représentent qu'une approximation, la moyenne étant obtenue à partir de 4 animaux et les variations individuelles étant importantes, surtout pour le poumon dont le C.A.D. varie de 16 à 116 dans les mêmes conditions d'expérience. Le poumon est l'organe qui nous a donné dans les opérations ultérieures les résultats les plus discordants.

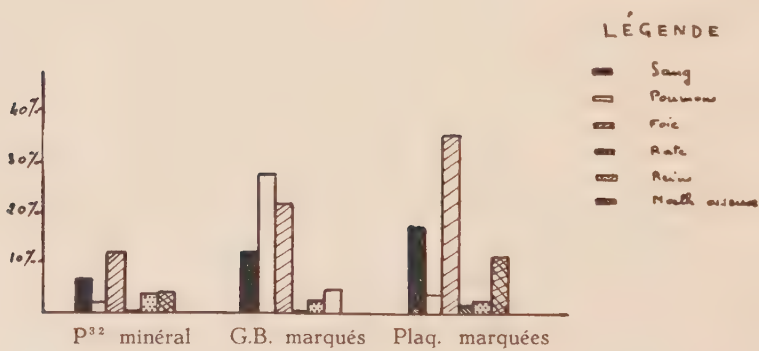
Néanmoins, il est certain que pour chaque animal, le C.A.D. décroît dans l'ordre que nous avons indiqué, ce qui garde toute leur valeur à ces mesures.

GRAPHIQUE I



C.A.D. ou coefficient d'absorption différentiel
(lapins sacrifiés 20 minutes après l'injection)

GRAPHIQUE II



Radioactivité par organe en pourcentage de la radioactivité injectée

Comparativement, la répartition de l'activité après l'injection de P^{32} inorganique se montre plus uniforme.

Si l'on considère le *pourcentage* fixé par organe ou tissu par rapport à l'activité totale injectée, on relève les valeurs suivantes :

	Globules blancs marqués (moyenne sur 4 animaux)	P^{32} inorganique (moyenne sur 4 animaux)
Sang	7,9	7,05
Poumon	29,2	2,25
Foie	22,7	12,5
Rate	0,6	0,22
Rein	2,6	4,1
Moelle osseuse	4,5	4,4

On voit que le poumon possède encore le principal rôle dans l'arrêt des leucocytes, fixant 29,2 % de l'activité initiale, le foie venant ensuite avec 22,7 %. La rate, par contre, doit à sa masse peu importante de ne retenir qu'une faible partie de la radioactivité totale, malgré un C.A.D. plus élevé que celui du foie.

Nous devons donc objectivement constater que la somme des activités fixées par les organes prélevés représente moins de 70 % dans trois expériences, et l'ensemble des résultats (sauf pour le foie) est en opposition avec ceux que nous exposons plus loin et qui découlent de l'utilisation du chrome comme traceur. Dans le seul cas où l'on retrouve 103 % de l'activité initiale, on note 56 % pour le poumon, correspondant à un C.A.D. de 116, ce qui l'apparente aux expériences réalisées avec le chrome.

L'injection de P^{32} inorganique est suivie d'une répartition plus uniforme, qui intéresse certainement d'autres secteurs de l'organisme (masses musculaires, tissu osseux, etc.). En conséquence, on ne retrouve dans les organes ou tissus que nous avons prélevés, qu'un faible pourcentage de l'activité totale injectée.

b) MARQUAGE PAR LE Cr^{51}

Sept lapins ont reçu par voie veineuse des leucocytes humains marqués par le radiochromate et ont été sacrifiés après vingt minutes. Les injections ont été réalisées au cours de quatre expériences différentes, ce qui est à retenir comme argument en faveur de la reproductibilité, tant du marquage lui-même que des résultats enregistrés chez l'animal. Dans les mêmes conditions de temps, des animaux

témoins ont reçu une dilution de la solution marquante dont l'activité était comparable à celle des leucocytes injectés.

Nous obtenons pour le C.A.D. au bout de vingt minutes :

	<i>Globules blancs marqués (moyenne sur 7 animaux)</i>	<i>Cr⁵¹ inorganique (moyenne sur 2 animaux)</i>
Sang	2,6	3,1
Poumon	150	3,6
Foie	7,4	6,2
Rate	5,4	2,3
Rein	4,4	20,5
Moelle osseuse	1	3,3

Le pouvoir de fixation par les poumons est ici beaucoup plus important que celui des autres organes ou tissus. Il faut noter également un pouvoir de fixation plus grand pour le foie que pour la rate, contrairement à ce que nous obtenons avec le P³². A ce propos, une réserve est à faire, les premiers échantillons de leucocytes marqués par le P³² ayant pu être contaminés par un nombre important de plaquettes.

L'injection de Cr⁵¹ inorganique est encore suivie d'une répartition assez uniforme. Cependant l'importance de l'élimination rénale du chrome est supérieure à celle de l'élimination du phosphore.

Le pourcentage de l'activité injectée s'exprime par le tableau suivant :

	<i>Globules blancs marqués (moyenne sur 7 animaux)</i>	<i>Cr⁵¹ inorganique (moyenne sur 2 animaux)</i>
Sang	14,8	18,4
Poumon	71,2	1,4
Foie	20,5	16,6
Rate	0,2	0,1
Rein	2	11,1
Moelle osseuse	2,1	7,5

Les deux valeurs à considérer à ce point de vue sont essentiellement celles du poumon et du foie, qui fixent une grande partie des leucocytes marqués. Le chiffre 71,9 % pour le poumon confirme les données apportées par de nombreux auteurs.

Le radiochromate inorganique se répartit d'une manière très différente. On constate :

1° Que le foie, le sang, les reins et la moelle osseuse possèdent en valeur relative, une forte activité par rapport au poumon dont le C.A.D. et l'activité totale sont très faibles.

2° Que la somme des activités enregistrées est seulement de 55,1 % alors qu'elle est de 110,8 avec les leucocytes marqués, ce qui suppose une répartition plus homogène dans l'organisme.

c) MARQUAGE PAR Au^{198}

Nous n'avons pour cette catégorie que des expériences préliminaires. Dans l'opération Jordanie, un seul lapin a été sacrifié, vingt minutes après l'injection de leucocytes marqués par l'or.

Voici les résultats :

	C.A.D.	% R.A.
Sang	0,6	4
Poumon	122	53
Foie	6,6	22,6
Rate	5	0,26
Rein	1,9	1,16
Moelle osseuse	1,2	2,5

Ce résultat confirme celui des opérations utilisant le P^{32} et le Cr^{51} , sous la réserve des affinités différentes du radioisotope choisi comme traceur et qui tend à s'accumuler préférentiellement dans certains organes, à mesure qu'il abandonne les leucocytes. Ce point mérite d'être considéré car un lapin témoin, recevant la solution marquante d'or colloïdal et sacrifié après vingt minutes, présente la répartition suivante où l'on relève une activité très forte au niveau du foie et de la moelle osseuse :

	C.A.D.	% R.A.
Sang	0,14	0,76
Poumon	0,61	0,45
Foie	28	83
Rate	2,35	1
Rein	0,08	0,4
Moelle osseuse	8,2	18

B) INJECTION AU LAPIN NORMAL DANS DES CONDITIONS EXPERIMENTALES MODIFIEES

1. FACTEUR TEMPS

Pour tenter de résoudre le problème posé par la fixation sélective démontrée chez l'animal sacrifié après vingt minutes, nous avons choisi de faire varier les délais horaires :

a) Chez les animaux morts rapidement après l'injection (cinq à dix minutes), la répartition est trop irrégulière pour en tirer une conclusion valable, que l'on emploie le P^{32} ou le Cr^{51} .

b) Dans les premières expériences réalisées avec le P^{32} , les animaux sont sacrifiés entre trente et quarante-cinq minutes après l'injection, à l'exemple de WEISBERGER. Chez 4 animaux, le C.A.D. moyen du poumon est de 46 (valeurs extrêmes 28 et 66) après trente minutes.

« Pour 3 animaux sacrifiés entre quarante et quarante-six minutes, il tombe à 10. Celui de la rate demeure inchangé (C.A.D. 13).

« Après trois heures, chez 2 autres animaux, le C.A.D. du poumon est de 9,5. Après trois jours, il se réduit à 0,84. » [67]

Mais la précarité du marquage par le P^{32} introduit une cause d'erreur particulièrement importante dans l'estimation de ces valeurs.

2. HÉPARINE

Ce choix répondait à l'hypothèse de travail suivante : éliminer le rôle possible d'une coagulation intravasculaire bloquant les globules blancs, et permettre éventuellement à ceux-ci de franchir la barrière pulmonaire. Un lapin, préparé par injection de 5 mg d'héparine, est sacrifié quarante minutes après injection de leucocytes marqués par le P^{32} . La fixation pulmonaire est faible mais cependant du même ordre que celle des animaux témoins sacrifiés dans les mêmes délais.

3. NOVOCAÏNE

Nous verrons plus loin que nos animaux immunisés ont reçu de la novocaïne pour parer aux accidents de choc anaphylactique. Il était intéressant de rechercher un effet propre à la novocaïne.

Quatre animaux sont préparés par injection de 1 ml de novocaïne à 2,5 % (la même dose que celle apportée chez les animaux immunisés) et reçoivent cinq minutes plus tard une suspension leucocytaire marquée par le P^{32} . Les animaux sont sacrifiés respectivement quinze, trente, quarante-cinq minutes et trois heures après l'injection. Les

résultats sont comparés avec ceux d'une série de 4 témoins ne recevant pas de novocaïne et sacrifiés dans les mêmes délais.

Les courbes obtenues par organe, en ce qui concerne le C.A.D. et le pourcentage de radioactivité, sont sensiblement parallèles. On serait tenté d'analyser ces courbes, mais en dehors du fait qu'on ne dispose que de peu de points pour les établir, la construction même de ces courbes est contestable, du fait de la faible stabilité du marquage par le radiophosphate.

4. HIBERNATION

Elle a été étudiée à l'aide de leucocytes marqués par le P^{32} .

« Quatre lapins sont soumis à l'hibernation artificielle ou biocémèse par le mélange M2 de Laborit : le C.A.D. pulmonaire chez ces 4 animaux refroidis jusqu'à $+32^{\circ}5$ et même $+23^{\circ}C$, et sacrifiés après vingt minutes, atteignait une valeur moyenne de 84 (chiffres extrêmes : 70 et 170), supérieure à celle de la moyenne de quatre témoins, soit 63. »

5. HYPERTHERMIE — PEPTONE

Inversement, nous avons cherché à obtenir une hyperthermie que nous avons provoquée par injection de peptone ($+39^{\circ}5$). Le C.A.D. pulmonaire après vingt minutes était en moyenne 102,6 et celui de la rate était élevé, 32 en moyenne.

Ce fait a paru étonnant car il permettait de considérer que la peptone favorisait la fixation des leucocytes par la rate. La somme des activités des organes représente ici environ 120 % de l'activité initiale.

Dans une deuxième série d'expériences, destinées à contrôler ces faits, nous utilisons des globules blancs marqués par le Cr^{51} . Voici les résultats obtenus après vingt minutes (moyenne de 4 animaux) :

	C.A.D.	% R.A.
Sang	1,8	9,9
Poumon	143	80
Foie	5	13,6
Rate	5,9	0,2
Rein	3,4	1,9
Moelle osseuse	1	2,2

La comparaison avec les animaux témoins ne montre aucune différence appréciable dans la répartition des activités.

6. GLOBULES BLANCS LYOPHILISÉS

Ils ont été étudiés dans 2 cas par injection de globules blancs lyophilisés, marqués par le P^{32} et repris en solution isotonique. Le premier animal est mort en trois minutes et le second, sacrifié après vingt minutes, présentait un C.A.D. pulmonaire de 19,7. Ce chiffre, inférieur à celui des témoins, indique qu'une partie seulement des leucocytes marqués et lyophilisés ont conservé leur morphologie : en effet, WEISBERGER et ses collaborateurs ont noté que les leucocytes morts, tant qu'ils ne sont pas entièrement désintégrés, sont arrêtés par le poumon.

7. IMMUNISATION ET SENSIBILISATION

a) « Un lapin avait été immunisé vis-à-vis des globules blancs humains, par injections répétées, jusqu'à ce que son sérum atteigne un titre d'agglutination spécifique de $1/128^e$. Vingt minutes après la transfusion de leucocytes humains marqués par le P^{32} , et contrairement à notre attente, le C.A.D. du poumon et celui de la rate présentaient des valeurs très faibles, respectivement 12 et 2,12. » [67]

b) Cette expérience a été répétée, cette fois avec des leucocytes marqués par le Cr^{51} . Cinq lapins ont été immunisés par injections répétées de globules blancs humains : ils recevaient par voie veineuse, deux fois par semaine et pendant trois semaines consécutives, environ 40 millions de leucocytes humains prélevés et lavés dans les conditions de routine [68]. Huit à dix jours après la dernière injection, la teneur en agglutinines était appréciée par une méthode d'agglutination directe. Le sérum des animaux retenus pour l'expérience présentait un taux d'agglutination de $1/160^e$ à $1/640^e$ vis-à-vis des leucocytes humains.

c) Ces expériences ont été complétées par l'étude des globules blancs sensibilisés par contact de cinq minutes avec un puissant sérum anti-leucocytaire (taux $1/640^e$), dilué de manière à éviter une lyse immédiate des leucocytes.

On obtient pour le C.A.D. les valeurs suivantes :

	<i>Lapins immunisés (moyenne sur 5 animaux)</i>	<i>Globules blancs sensibilisés (moyenne sur 4 animaux)</i>	<i>Témoins (moyenne sur 7 animaux)</i>
Sang	5,4	5	2,6
Poumon	55,4	102	150
Foie	3,4	3	7,4
Rate	2,2	3,1	5,4
Rein	10,5	11,4	4,4
Moelle osseuse	1,25	1	1

On remarque la forte activité du sang et des reins, liée probablement à une destruction intravasculaire des globules blancs, libérant le Cr⁵¹. L'activité du plasma seul n'avait pas été mesurée.

La fixation par le poumon est très réduite par rapport aux témoins, ainsi que celle du foie et de la rate, mais il serait ici souhaitable, pour le vérifier, de sacrifier les animaux, au delà de vingt minutes, ce qui est au programme de prochaines expériences.

On obtient, en pourcentage de l'activité totale, un tableau dont la lecture donne lieu aux mêmes conclusions.

	<i>Lapins immunisés</i> (moyenne sur 5 animaux)	<i>Globules blancs</i> <i>sensibilisés (moyenne</i> <i>sur 4 animaux)</i>	<i>Témoins (moyenne</i> <i>sur 7 animaux)</i>
Sang	30	27,8	14,8
Poumon	27	54,6	71,2
Foie	8,5	13,3	20,5
Rate	0,13	0,12	0,2
Rein	5,65	4,5	2
Moelle osseuse	2,7	2,09	2,1

On constate la même activité dans le sang et les reins par injection de leucocytes sensibilisés qu'avec les animaux immunisés. Les autres valeurs sont intermédiaires entre celles des animaux immunisés et celles des témoins.

C) AUTRES ANIMAUX

Notre expérience est beaucoup moins étendue que sur le lapin ; si bien que l'inventaire de différentes espèces animales que nous aurions souhaité établir est demeuré incomplet.

Nous apportons néanmoins des résultats partiels :

a) TRANSFUSION AU CHIEN DE LEUCOCYTES HUMAINS MARQUÉS PAR LE P³²

Deux chiens reçoivent la suspension marquée dans la veine saphène externe. Vingt minutes après, ils sont sacrifiés par injection de sulfate de magnésie hypertonique. On enregistre un C.A.D. de 13,5 et 23,5 pour le poumon. Cette valeur est moins élevée que chez le lapin mais tire sa signification du fait que le C.A.D. d'un autre

chien perfusé par du P^{32} inorganique est seulement de 2,66. La somme des activités mesurées représente seulement 74 % de la totalité.

b) TRANSFUSION AU COBAYE DE LEUCOCYTES HUMAINS MARQUÉS
PAR LE P^{32}

L'injection est pratiquée dans la veine jugulaire et les 2 cobayes utilisés sont sacrifiés par incision du cou. Le C.A.D. pulmonaire est plus élevé que pour le chien : 29 et 36, mais encore très inférieur à celui qui est calculé pour le lapin. On note une forte radioactivité au niveau du foie (C.A.D. 12,7 et 11,9) et de la rate (37,5 et 9,9).

Pour ces animaux, on risque des erreurs importantes dans les pesées et les prélèvements, du fait de la petitesse des organes.

c) ESSAI D'UN SYSTÈME DE PERFUSION CŒUR-POUMON ISOLÉ

« Pour plus de facilité, nous avons opéré sur un chien de 12 kg. dont le cœur et les poumons étaient préparés selon la technique de GAUTRELET. Le système isolé recevait, sous une faible pression, la suspension de leucocytes humains marqués, dont l'activité totale était de 10.270.000 coups/minute.

« Après trente-cinq minutes d'irrigation par le propre sang de l'animal, suivi d'un liquide de Locke, on a mesuré séparément la radioactivité du cœur et des deux poumons (après calcination totale) et celle des liquides perfusés recueillis à l'orifice aortique. Mais les battements du cœur isolé étaient à peine perceptibles, et l'expérience a été viciée par des coagulations entraînant une répartition non homogène. Le poumon droit avait fixé 2 %, le poumon gauche 15 % de la radioactivité totale. » [67]

d) ESSAI DE MARQUAGE DES LEUCOCYTES DU CHEVAL : INJECTION
AU LAPIN

A l'occasion d'une séparation de globules blancs à partir de sang citraté de cheval, réalisée au laboratoire, nous avons tenté de marquer ces leucocytes par le Cr^{51} et par l' Au^{198} . Le rendement du marquage a été faible :

- 1,4 % pour le radiochromate, soit $1,3 \cdot 10^{-3}$ /coups/minute par leucocyte ;
- 0,07 % pour l' Au colloïdal, soit $3,7 \cdot 10^{-6}$ /coups/minute par leucocyte.

Deux lapins ont été injectés et sacrifiés après vingt minutes.

— *Lapin injecté par les leucocytes de cheval marqués par Cr^{51} :*

	C.A.D.	% R.A.
Sang	2,9	16
Poumon	141	57,8
Foie	10,2	30,5
Rate	13,8	0,7
Rein	3,1	1,8
Moelle osseuse	1,6	3,6

— *Lapin injecté par les leucocytes de cheval marqués par Au^{198} :*

	C.A.D.	% R.A.
Sang	8	43
Poumon	117	56
Foie	14	42
Rate	4	0,1
Rein	1,7	1,1
Moelle osseuse	2	4,3

Les valeurs trouvées pour le sang (établies sur une moyenne de deux échantillons) sont particulièrement élevées : les activités injectées étaient très faibles, ce qui a pu favoriser les erreurs de mesure.

CHAPITRE IV

DISCUSSION

APPLICATIONS CLINIQUES ET THERAPEUTIQUES

Le marquage des leucocytes par les isotopes radioactifs a ouvert à l'expérimentation une voie très large.

Nous ne prétendons pas avoir épuisé le sujet, mais nous disposons néanmoins d'éléments suffisants pour en déduire des applications d'ordre biologique et thérapeutique.

Auparavant, nous nous proposons de discuter :

- 1° le choix de l'isotope radioactif ;
- 2° l'interprétation des résultats ;
- 3° la comparaison de ces résultats suivant les espèces envisagées ;
- 4° les enseignements apportés par certaines variantes expérimentales ;
- 5° les facteurs immunologiques.

I. — DISCUSSION

A) CHOIX DE L'ISOTOPE

Nous limiterons ici notre discussion à trois procédés qui ont été utilisés au laboratoire du Centre de Transfusion et Réanimation de l'Armée.

Tous sont des procédés de marquage « in vitro » qui ont fait appel dans l'ordre chronologique au P^{32} , au Cr^{51} et à l' Au^{198} .

a) Le marquage par le P^{32} sous forme de phosphate disodique pouvait apparaître plus physiologique. Néanmoins, il exige une incu-

bation de longue durée (une à deux heures à $+ 37^{\circ} \text{C}$) et paraît assez précaire, ainsi que l'ont indiqué des essais de fractionnement chimique.

b) Le marquage par le Cr^{51} sous forme de radiochromate de sodium exige une incubation beaucoup plus courte (cinq à dix minutes à $+ 37^{\circ} \text{C}$) et, à efficacité égale, sa stabilité est certainement supérieure à celle du marquage précédent.

D'autre part, il présente l'avantage d'une plus grande sensibilité de mesure, à l'aide du compteur à scintillations, et nous permet d'envisager une localisation par voie externe.

c) Enfin, dernier venu et encore inédit, le marquage par l' Au^{198} sous forme d'or colloïdal demande une incubation de cinquante minutes à $+ 37^{\circ} \text{C}$. Son efficacité est en général inférieure à celle des marquages par les précédents radioisotopes, mais sa stabilité est très grande. Nous croyons pouvoir insister sur ce dernier caractère qui permet d'utiliser des leucocytes ainsi marqués dans des expériences de plus longue durée. La très grande sensibilité du compteur à scintillations, à l'égard des rayonnements de l'or colloïdal, permet d'utiliser de plus faibles doses. Une localisation par voie externe est également possible.

Autre point à considérer, quel est le *mode de fixation de ces radioisotopes sur les leucocytes* ?

En ce qui concerne le P^{32} , son incorporation « in vivo » a été largement étudiée et l'on en sait l'intérêt pour la connaissance du métabolisme des acides nucléiques. Le mode de fixation « in vitro » est moins bien connu ; dans nos conditions de marquage, il semble bien que sa pénétration dans le compartiment organique soit très limitée, puisque la majorité du P^{32} se retrouve dans la fraction acidosoluble. D'où la précarité du marquage.

Le Cr^{51} sous forme de radiochromate de sodium, a la propriété de traverser la membrane des hématies dont il réalise le marquage. Sous forme de chlorure de chrome trivalent, il ne possède pas cette propriété mais il marque énergiquement les protéines du plasma. Il est permis de penser que le radiochromate traverse la membrane des leucocytes mais qu'il est capable d'en sortir par la suite par échange avec le milieu ambiant.

Cette dernière éventualité semble démontrée par nos contrôles de stabilité.

Nous n'avons pas l'expérience du marquage des leucocytes par le chlorure de chrome. Mais l'effet de l'introduction de l'acide ascorbique dans l'un de nos protocoles expérimentaux (« Bain-Marie »)

laisse supposer que le chrome ne marque les leucocytes que sous la forme d'ion chromate. La réduction s'oppose à la prolongation du marquage.

Quant au marquage par l'or colloïdal, il semble s'opérer par un mode tout différent. S'agit-il réellement d'une phagocytose de particules colloïdales, d'une adsorption ou d'un phénomène chimique ? Nous manquons d'arguments pour y répondre.

Il est curieux de rappeler que FIESSINGER et LAUR, dans un travail cité par Jean BERNARD en 1934 [101], avaient noté une fixation de l'or par les leucocytes des sujets traités par la chrysalbine ou l'allochrysine. Ceci serait en faveur d'une affinité des leucocytes pour l'or-élément puisque dans ces expériences il ne s'agissait pas d'or colloïdal, mais de sels d'or.

Quoi qu'il en soit, ce marquage est efficace et stable.

Quel que soit l'isotope utilisé, nous constatons une convergence remarquable dans les résultats expérimentaux. Les seules divergences relevées semblent tenir aux différences d'affinité des organes ou tissus à l'égard de telle ou telle solution marquante, comme le montrent les injections de solution à l'état inorganique.

B) INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Nous avons expérimenté le plus souvent avec un matériel biologique hétérogène, à savoir les leucocytes humains injectés à des animaux d'espèces différentes. D'autre part, nos leucocytes étaient marqués « *in vitro* ». Nos conditions expérimentales s'opposent donc à celles de WEISBERGER et collaborateurs par trois points essentiels. Ces auteurs utilisaient en effet un marquage des *leucocytes d'exsudat* péritonéal, marqués « *in vivo* » et les injectaient à d'autres *lapins*.

Cependant, nous sommes parvenus au même résultat fondamental, à savoir la fixation élective au niveau des poumons du lapin des leucocytes transfusés.

A la suite de WEISBERGER, nous avons limité nos prélèvements à six organes ou tissus (le sang, la moelle osseuse, le poumon, le foie, la rate et les reins). Ce choix était forcément arbitraire mais il a paru correspondre à la destination réelle des éléments transfusés. En effet, chez le lapin, la somme des activités mesurées a souvent avoisiné 100 % de l'activité injectée. Or, la somme des poids de ces organes ou tissus représente environ 1/7^e du poids du lapin. Nos protocoles expérimentaux ont même fait apparaître quelquefois des valeurs supérieures à 100 %, chez les lapins normaux sacrifiés après vingt minutes.

N'existerait-il pas de façon constante, *une erreur par excès* que nous n'avons pu encore mettre en évidence (présence de thrombus dans certains échantillons, erreur dans la mesure par sédimentation de particules radioactives), *une erreur par défaut* (défaut d'homogénéité d'une suspension de globules blancs : en effet, de nombreuses manipulations sont nécessaires et des agglutinats de globules blancs sont inévitables) ?

Certaines variantes expérimentales ne nous ont permis de retrouver qu'un faible pourcentage de l'activité injectée. Il s'agissait soit d'animaux sacrifiés dans un plus long délai, soit d'animaux immunisés, soit d'espèces autres que le lapin. Le déficit peut tenir soit à une élimination urinaire importante du radioisotope (P^{32} ou Cr^{51}), soit à une localisation dans des secteurs de l'organisme non soumis à la mesure.

C) COMPARAISON DE CES RÉSULTATS SUIVANT LES ESPÈCES ENVISAGÉES

Des quelques expériences réalisées en dehors du lapin, nous ne pouvons tirer que des conclusions sommaires. Cependant, l'activité du poumon humain dans les deux cas où nous avons pu disposer de pièces opératoires était relativement faible (C.A.D. 6,1 et 13).

Chez les deux chiens, sacrifiés vingt minutes après injection des leucocytes marqués, le C.A.D. pulmonaire était respectivement de 13,5 et de 23,5.

Seul le cobaye, autre rongeur, se rapprochait sensiblement du lapin avec un C.A.D. pulmonaire de 29 et 36. Nous ne suivrons pas certains auteurs qui ont tenté d'expliquer les différences de localisation de la tuberculose, selon les espèces, par l'affinité plus ou moins grande des leucocytes, vecteurs supposés du bacille de Koch, à l'égard du poumon. Cependant, il est piquant de relever un argument de poids en faveur de cette thèse.

D) ENSEIGNEMENTS APPORTÉS PAR CERTAINES VARIANTES EXPÉRIMENTALES

Notre protocole de base comportait le sacrifice, après vingt minutes, de lapins normaux ayant reçu par voie intraveineuse une suspension de leucocytes humains récemment marqués. Certaines modifications expérimentales ont été introduites dans le but d'éliminer les conditions de l'arrêt pulmonaire.

a) S'agit-il d'une séquestration temporaire ou d'un arrêt définitif ?

Les quelques expériences comportant un sacrifice retardé (une heure, trois heures, vingt-quatre heures) ont montré une décroissance régulière de l'activité pulmonaire mais sans bénéfice apparent au profit d'autres organes. Il est vrai que le marquage par le P^{32} est trop labile pour permettre de suivre réellement ces leucocytes. Jusqu'à plus ample informé, nous pouvons donc faire nôtres les conclusions de BIERMAN [12] et de Jean BERNARD, MATHÉ et LISSAC [9 - 61 - 63] qui prêtent au poumon un rôle de séquestration et non de destruction.

b) Nous avons cherché à modifier, sans y parvenir, les conditions circulatoires du poumon, par addition, soit d'héparine, soit de novocaïne.

c) Soulignons le fait que l'hibernation artificielle comportant après préparation pharmacologique un refroidissement effectif jusqu'à $+ 32^{\circ}5$ et même $+ 23^{\circ} C$ chez le lapin, a encore accru l'importance de la captation leucocytaire par le poumon.

Nous pouvons en rapprocher une constatation faite par les auteurs américains [103] chez des animaux mis en hypothermie, qui présentent une baisse considérable du taux des plaquettes et des leucocytes du sang périphérique. Ces éléments reviennent à leur valeur normale lors du réchauffement de l'animal. Il y a donc eu séquestration viscérale sous l'influence des conditions thermiques. En sens inverse, une hyperthermie d'ailleurs modeste ($+ 1$ à $2^{\circ} C$) ne modifiait en rien les conditions de la fixation pulmonaire.

E) FACTEURS IMMUNOLOGIQUES

Des lapins, solidement immunisés vis-à-vis des leucocytes humains, ont été sacrifiés vingt minutes après une injection de leucocytes marqués, pratiquée dans les conditions habituelles.

Or l'importance de la fixation pulmonaire n'a pas été accrue mais sensiblement réduite, tandis que l'activité du sang circulant et celle des reins dépassaient celle des témoins.

Nous attribuons ce fait à une destruction intravasculaire massive des leucocytes transfusés. Le total des activités correspondant à différents prélèvements n'atteint que 74 % de l'activité injectée.

II. — APPLICATIONS CLINIQUES ET THÉRAPEUTIQUES

Quels enseignements pouvons-nous tirer de ces expériences du point de vue clinique et du point de vue thérapeutique ?

On connaît l'importance prise actuellement par l'immuno-hématologie et les questions que pose le mode d'action des anticorps anti-leucocytaires.

Il est intéressant de savoir si ces anticorps agissent directement sur ces leucocytes ou sur les organes hématopoïétiques, et quels viscères exercent une fonction de retrait sur les leucocytes sensibilisés par contact avec ces anticorps. Nous ne pouvons pas donner à ce problème une solution générale, mais nous apportons deux arguments :

1° Un immun-sérum antileucocytaire est capable de détruire directement des leucocytes vis-à-vis desquels il a été préparé.

2° Il ne semble pas que la rate et le poumon participent spécialement à l'arrêt des leucocytes sensibilisés.

Un précieux élément de comparaison nous est fourni par les expériences effectuées sur les plaquettes sanguines (*). Alors que le lapin normal, vingt minutes après l'injection de plaquettes marquées par l'or colloïdal, les localise principalement dans la rate, le foie et la moelle osseuse, le lapin immunisé les localise dans le poumon. Si l'on prolonge l'expérience, le poumon de ces lapins perd progressivement son activité au profit des autres organes du système réticulo-endothélial.

Sur le plan thérapeutique, deux points sont à considérer :

1° Il est actuellement impossible de réussir une transfusion de leucocytes, dans le sens d'un enrichissement en globules blancs de la circulation du receveur.

2° On pourrait envisager à l'inverse, d'utiliser la séquestration des leucocytes dans le poumon pour porter à cet organe des isotopes radioactifs fixés sur les globules blancs, dans un but thérapeutique.

(*) LEMOINE, *Thèse*, Paris, 1957.

CONCLUSIONS

I. — Le destin des leucocytes transfusés pose un problème qui demeure d'actualité : les progrès des techniques de séparation et de transfusion ne permettent pas, en effet, d'obtenir un enrichissement durable en leucocytes de la circulation du receveur, quel que soit le chiffre antérieur.

II. — TECHNIQUES UTILISÉES

Le marquage chimique par des colorants, réalisé jusqu'à ces dernières années par de nombreux auteurs, a fourni des résultats contradictoires. Le marquage par un radioisotope jouant le rôle de traceur apparaît un moyen d'étude plus séduisant. Les différentes méthodes ont été passées en revue.

A la suite de WEISBERGER et collaborateurs, mais dans des conditions différentes, le P^{32} , sous forme de phosphate disodique, a d'abord été utilisé. Mais en raison de sa labilité, ce mode de marquage a été abandonné au profit du radiochromate de sodium (Cr^{51}) et plus récemment nous avons inauguré le marquage « in vitro » par l'or colloïdal radioactif. La stabilité de ce dernier est remarquable, ainsi que nous l'avons établi par divers contrôles.

Au cours de ce travail, des progrès ont été réalisés dans la pureté cytologique des préparations obtenues. De nombreux contrôles ont été pratiqués : en particulier la comparaison a été faite avec les données de l'injection, chez les mêmes sujets d'expérience, de plaquettes marquées ou de solutions marquantes à l'état inorganique.

III. — RÉSULTATS

A) *Chez l'homme*, les trois expériences conduites avec des leucocytes marqués par le P^{32} nous ont confirmé la disparition rapide, de la circulation du receveur, des globules blancs transfusés. Dans les deux cas où la transfusion était associée à une exérèse pulmonaire, la mesure directe de l'activité sur des fragments de poumon, 20 minutes

après l'injection, nous a donné des valeurs relativement faibles, quoique supérieures à l'activité du sang au même moment. Nous ne pouvons donc en tirer une conclusion formelle pour désigner l'organe responsable de l'arrêt des leucocytes.

B) *Chez l'animal*, la plupart de nos expériences ont porté sur le lapin :

a) Quel que soit l'isotope radioactif choisi, l'organe qui présente la plus grande activité, 20 minutes après l'injection, est le poumon. Cependant, des différences de degré apparaissent selon qu'il s'agit de leucocytes marqués par le P^{32} (après 1 heure d'incubation), ou de leucocytes marqués par le Cr^{51} (après 5 ou 10 minutes d'incubation). Dans le premier cas, le C.A.D. est de 63 et le pourcentage de radioactivité est de 28 % (moyenne sur 4 animaux). Dans le second cas, le C.A.D. dépasse 100 et le pourcentage de l'activité totale injectée, fixée par le poumon, est de l'ordre de 70 % (moyenne sur 7 animaux).

Par rapport au poumon, le foie présente un C.A.D. de 4 à 15 selon les expériences et le pourcentage de l'activité totale atteint 15 à 22 %. L'activité des autres organes prélevés est négligeable.

L'évolution avec le temps n'a pu être suivie valablement, en raison de la précarité du marquage des leucocytes par le P^{32} .

b) Nous avons modifié les conditions d'expérience pour préciser le rôle d'arrêt du poumon et réduire éventuellement l'importance de ce facteur : ni la préparation des animaux par l'héparine ou l'hibernation artificielle, ni l'addition de novocaïne n'ont changé significativement les résultats. La peptone nous a donné des résultats contradictoires.

c) Chez le lapin immunisé par injections répétées de leucocytes humains, l'activité des poumons et du foie, 20 minutes après la transfusion de leucocytes marqués, est inférieure à celle des animaux témoins. Ceci correspond vraisemblablement à une lyse importante des éléments transfusés, comme l'indique l'activité plus forte du sang et des reins.

IV. — CONCLUSIONS GÉNÉRALES

De nouvelles techniques de séparation et de marquage « *in vitro* » des leucocytes humains par des radioisotopes, ont été mises au point.

Des transfusions de leucocytes marqués ont été réalisées chez l'homme. Mais nous tirerons notre principal enseignement d'expériences pratiquées sur le lapin.

Quel que soit le traceur choisi (P^{32} , Cr^{51} , Au^{198}), nos résultats confirment l'importance du rôle du poumon dans l'arrêt des leucocytes

transfusés. Bien que nous ayons opéré sur un matériel hétérogène (leucocytes humains injectés au lapin), nous rejoignons ainsi les conclusions apportées par des auteurs tels que WEISBERGER et Jean BERNARD, MATHÉ, LISSAC.

Il ne nous est cependant pas possible de préciser actuellement s'il s'agit d'une fixation définitive ou d'une séquestration temporaire. A la lumière d'autres expériences et de données cliniques, cette seconde hypothèse est plus vraisemblable.

Cependant, la rétention par le poumon des leucocytes transfusés est indépendante des conditions d'expérience et dans l'état actuel de la technique, elle apparaît inéluctable.

Vu, le Doyen :
BINET

Vu, le Président de Thèse :
FAUVERT

Vu et Permis d'imprimer,
le Recteur de l'Académie de Paris :
SARRAILH

BIBLIOGRAPHIE

1. ADORF (A.). — Zur Frage der Nachweisbarkeit, Lebensfähigkeit und Lebensdauer transfundierten Leukozyten. (*Die Medizinische*, 1953, 5, 145-147.)
2. AMBRUS (J.L.), AMBRUS (C.M.), PACKMAN (E.W.), JOHNSON (G.C.), BACK (N.), CHERNICK (W.) et HARRISSON (J.W.E.). — Role of the lungs in fate of white blood cells. (*Fed. Proc.*, 1953, 12, 298.)
3. AMBRUS (C.M.), AMBRUS (J.L.), JOHNSON (G.C.) et HARRISSON (J.W.E.). — Fate of leukocytes in the pulmonary circulation and the effect of drugs thereon. (*Fed. Proc.*, 1954, 13, 330.)
4. AMBRUS (J.L.), AMBRUS (C.M.), JOHNSON (G.C.) et HARRISSON (J.W.E.). — Leukocyte removal by in situ isolated organs and effects of drugs thereon. (*Fed. Proc.*, 1954, 13, 331.)
5. AMBRUS (C.M.), AMBRUS (J.L.), JOHNSON (G.C.), PACKMAN (E.W.), CHERNICK (W.S.), BACK (N.) et HARRISSON (J.W.E.). — Role of the lungs in regulation of the white blood cells level. (*Am. J. Physiol.*, 1954, 178, 33-34.)
6. ARRAU (C.M.) et BELLO (L.R.). — La leucotransfusion en el tratamiento de ciertas hemopatías: caso de agranulocytosis. (*Rev. Med. Chile*, 1944, 72, 939-941.)
7. AMAYA (K.). — Accumulation of transfused lymphocytes in the bone marrow of saponin poisoned rabbits. (*Acta Hem. Jap.*, 1956, 18, 69-78.)
8. BARDAWILL (C.J.), BRITTON (A.) et WIGHTMAN (K.J.R.). — Phosphor turnover in normal and leukemic leukocytes. (*J. Clin. Inv.*, 1953, 32, 553.)
9. BERNARD (J.), MATHÉ (G.) et LISSAC (J.). — Contribution expérimentale à l'étude du rôle du poumon dans la régulation leucocytaire. (*V^e Congrès Intern. Europ. Hématologie*, Fribourg Br., 1955.)
10. BIERMAN (H.R.), KELLY (K.H.), BYRON (R.L.) et CORDES (F.L.). — The behavior of the formed elements of the blood during leukocytes infusion and cross-transfusion in man. (*J. Lab. Clin. Med.*, 1954, 33, 918.)
11. BIERMAN (H.R.), BYRON (R.L.), KELLY (K.H.) et PETRAKIS (N.L.). — The lung removal mechanism for leukocytes. (*Blood*, 1951, 6, 770.)

12. BIERMAN (H.R.), BYRON (R.L.) et LANMAN (J.T.). — The disappearance of leukemic cells in non-leukemic recipients during transfusion and cross-circulation studies. (*III^e Congrès Européen d'Hématologie*, Cambridge, 1950, p. 26.)
13. BIERMAN (H.R.), cité par DOAN (C.A.). — In « The preservation of the formed elements and of the proteins of the blood ». (*Conférence Boston*, 1949, p. 63.)
14. BIERMAN (H.R.), KELLY (K.H.), CORDES (F.), WHITE (L.P.) et LITTMAN (A.). — The hematological response of leukemic and non-leukemic patients to intravenous histamine. (*J. Cancer Res.*, 1952, 12, 248-249.)
15. BINDA (B.) et GHIRARDO (G.). — L'impiego separato dei vari componenti corpuscolati di sangue nella pratica trasfusionale. (*Minerva Medica*, 1956, 47, 1.989-1.993.)
16. BORCHI (B.). — Azione dei leucociti omologhi e eterologhi iniettati negli animali. (*Boll. Ist. Sier. Milan*, 1931, 10, 46-49.)
17. BORCHI (E.). — Effetti dell'iniezione di leucociti omologhi e eterologhi negli animali. (*Bull. Soc. It. Biol. Sper.*, 1930, 5, 396-394.)
18. BRECHER (G.), WILBUR (K.M.) et CRONKITE (E.G.). — Transfusion of separated leukocytes into irradiated dogs with aplastic marrows. (*Proc. Soc. Exper. Biol. Med.*, 1953, 84, 54-56.)
19. BURKE (J.D.). — Blood volume in mammals. (*Physiol. Zool.*, 1954, 27 [1], 1-21.)
20. CHRISTELLER (E.) et EISNER (G.). — Ueber die verteilung art eigener in die Blutbahn transplantierten Leukocyten im Organismus und ihre Bedeutung für die Entzündung. (*Beitr. Path. Anast.*, 1928-1929, 81, 524-546.)
21. CONGDON (C.C.), MAC KINLEY (T.W. Jr.), SUTTON (H.) et URSO (P. Jr.). — The effect of transfusions of blood showing extreme leukocytosis on survival of X irradiated mice. (*Radiation Research*, 1956, 5, 424-434.)
22. CORELLI (F.) et PULITANO (E.). — Trasfusione di sangue e plasma. (Rome, 1951, 1 vol., p. 281, p. 452.)
23. CRONKITE (E.P.) et BRECHER (G.). — The protective effect of granulocytes in radiation injury. (*Ann. N.Y. Acad. Sc.*, 1955, 59, 815-833.)
24. CRONKITE (E.P.) et BRECHER (G.). — Sort des leucocytes transfusés dans les chiens atteints d'aplasie de la moelle osseuse. (*Le Sang*, 1955, 26, 2, 260-262.)
25. DAUSSET (J.) et MAUPIN (B.). — Indications des dérivés du sang dans le traitement des agranulocytoses. (*Le Sang*, 1956, 27, 1, 21-29.)
26. DOAN (C.A.), ZERFAS (L.G.), WARREN (S.) et AMES (O.). — A study of the mechanism of nucleinate induced leucopenic and leucocytic states, with special reference to the relative roles of liver, spleen, and bone marrow. (*J. Exper. Med.*, 1928, 47, 403.)
27. DREYFUS (B.). — Destin des granulocytes transfusés. (*Le Sang*, 1948, 19 [6], 570.)

28. ERF (L.A.) et LAWRENCE (J.H.). — Clinical studies with the aid of radioactive phosphorous: I, The absorption and distribution of radiophosphorous in the blood and its excretion by normal individuals and patients with leukemia. (*J. Clin. Inv.*, 1941, 20, 567-575.)
29. ESSEX (H.E.) et GRANA (A.). — Behavior of the leukocytes of the rabbit during periods of transient leukopenia variously induced. (*Am. J. Phys.*, 1949, 158, n° 3, 396-400.)
30. FARR (R.S.). — Experiments on the fate of the lymphocyte. (*Anat. Rec.*, 1951, 109, 515-523.)
31. FARR (R.S.). — Experiment on the fate of the transfused leukocytes. (*Anat. Rec.*, 1946, 94, 460.)
32. FICHTELIUS (K.E.). — On the fate of the lymphocyte. (*Acta Anat.* (suppl.), 1953, 19, 1.)
33. FICHTELIUS (K.E.). — The deposition of transfused labeled lymphocytes with radioactive phosphorus: preliminary report. (*Acta Soc. Med. Upsalien*, 1951, 56, 226-231.)
34. FICHTELIUS (K.E.). — Biphasic appearance in the blood of radioactively labeled lymphocytes. (*Acta Soc. Med. Upsalien*, 1951, 56, 89-93.)
35. FICHTELIUS (K.E.). — The deposition of transfused lymphocytes labeled with P^{32} . (*Acta Soc. Med. Upsalien*, 1951, 56, 225-231.)
36. FLECK (L.), LILLE-SZYSZKOWICZ (I.), BORECKA (D.) et RUSZCZYK (K.). — Les poumons comme organe d'élimination des microbes. (*Le Sang*, 1957, 28, 188-195.)
37. FUKUI (S.), YOSHIOKA (K.), IKBOKA (K.) et MATSUNAGA (T.). — A study of the distribution and fate of lymphocyte labeled with acriflavine. (*Acta Haematol. Jap.*, 1953, 16, 66-67.)
38. GIBSON (J.G.), EVANS (R.D.) et VALLÉE (B.L.). — Studies on leukocytes using radioactive zinc. In « The preservation of the formed elements, etc. ». (*Conf. Boston*, 1949, p. 59.)
39. GRAHAM (J.A.) et FOWLER (W.M.). — Behavior of the recipient's leukocyte count following transfusion of preserved blood. (*J. Lab. Clin. Med.*, 1941, 26, 1911-1913.)
40. HABELMANN (G.). — Die Lebensdauer transfundierten Leukocyten. (*Klin. Woch.*, 1942, 21, 904-908.)
41. HAMILTON (L.). — Isotopes in the study of leucocytes. (*6th Congress Intern. Soc. Hematology*, Boston, 1956, n° 204, summ. p. 215.)
42. HANAUSEK (J.). — Bases expérimentales de la transfusion des leucocytes. (*Acta Med. Scand.*, 1938, 98, 128-135.)
43. HANAUSEK (J.). — Bases expérimentales de la transfusion des leucocytes. (*J. Physiol. et Path. Gén.*, 1937, 368.)
44. HEINLE (R.W.), WEISBERGER (A.S.) et GUYTON (R.A.). — Mechanism of removal of transfused lymphocytes. (*J. Lab. Clin. Med.*, 1950, 36, 832.)

45. HIRSCH (E.O.) et GARDNER (F.H.). — Transfusion of granulocytes. (*J. Lab. Clin. Med.*, 1952, 39, 556-569.)
46. HOLLINGSWORTH (J.W.), FINCH (S.C.) et BEESON (P.B.). — The role of transfused leukocytes in experimental bacteremia of irradiated rats. (*J. Lab. Clin. Med.*, 1956, 48, 227-236.)
47. HOLLINGSWORTH (J.W.), FINCH (S.C.) et CHANG (C.H.). — Study of leukocyte dynamics by means of cross-circulation between normal and leukopenic rats. (*Blood*, 1956, 11 [5], 665-672.)
48. HUMPHREY (V.H.). — The mechanism of Arthus reactions: the role of polymorpho-nuclear leukocytes and other factors in reversed passive Arthus reactions in rabbits. (*Brit. J. Exp. Path.*, 1955, 36 [3], 263-282.)
49. JEANNENEY (G.) et RINGENBACH (G.). — Traité de la transfusion sanguine. (Masson édit., 1 vol., 1940, 328-329.)
50. JULLIARD (J.), MAUPIN (B.), LOVERDO (A.), BERNARD (J.), COLVEZ (F.), LECOMTE (M.). — Premiers essais de transfusion à l'homme de leucocytes et plaquettes marqués au radiophosphore. (*Presse Méd.*, 1952, 24, 518-520.)
51. JULLIARD (J.), MAUPIN (B.), CHARY (R.), THEILLEUX (R.), NAI (P.) et LOVERDO (A.). — Transfusion au lapin de leucocytes et de plaquettes du sang humain après marquage par le radiophosphore. (*C.R. Société de Biologie*, 1952, 146, 211-213.)
52. KEYNES (G.). — In: *Blood Transfusion* (Londres, Simpton, 1949, 95.)
53. KLINE (D.L.) et CLIFTON (E.E.). — Measurements of life span of white blood cells with P³². (*Fed. Proc.*, 1952, 11, 84.)
54. KRAINTZ (L.), TALMAGE (R.V.). — Distribution of radioactivity following intravenous administration of trivalent chromium 51 in the rat and rabbits. (*Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1952, 81, 490-492.)
55. LAINER (F.). — Die Behandlung der Agranulocytose mit Fieber Blut Transfusionen. (*Klin. Woch.*, 1937, 41, 1435.)
56. LANDUCCI (L.). — Sulla durata in vita dei leucociti transfusi in vitro. (*Il Lattante*, 1947, 360-364.)
57. LANMAN (J.T.), BIERMAN (H.R.) et BYRON (R.L. Jr.). — Transfusion of leukemic leukocytes in man. Hematologic and physiologic changes. (*Blood*, 1950, 5, 1099-1113.)
58. LEAHY (W.V.C.), MAC NICKLE (T.F.) et SMITH (P.K.). — Physiological disparition of radiophosphorous labeled leukocytes. (*Fed. Proc.*, 1954, 13, 378.)
59. LEAHY (W.V.C.), MAC NICKLE (T.F.) et SMITH (P.K.). — Fate of injected radiophosphorous labeled leukocytes. (*Am. J. Physiol.*, 1954, 179, 3, 570-576.)
60. LEVINE (S.). — Magnetic techniques for in vitro isolation of leucocytes. (*Science*, 1956, 123, 185-186.)

61. LISSAC (J.), MATHÉ (G.), BOIRON (M.) et BERNARD (J.). — Contribution expérimentale à l'étude du rôle du poumon dans la régulation leucocytaire. (*Le Sang*, 1955, 26, [5], 501-509.)
62. LISSAC (J.). — La durée de vie des leucocytes. (*Rev. Franç. Etudes Clin. et Biol.*, 1957, 11, 178-196.)
63. LISSAC (J.). — Etude du séjour vasculaire des polynucléaires par une méthode utilisant un indicateur fluorescent. Rôle régulateur du poumon. (*Thèse*, Paris, 1956.)
64. MAC CALL (M.S.), SUTHERLAND (A.), EISENTRAIT (A.M.) et LANZ (H.). — The tagging of leukemic leukocytes with radioactive chromium and measurement of the in vivo cell survival. (*J. Lab. Clin. Med.*, 1955, 45 [5], 717-724.)
65. MAC CONNELL (K.P.). — Fixation of selenium in dog leukocytes. (*Fed. Proc.*, 1954, 13, 262.)
66. MARMONT (A.) et FUSCO (F.). — Il problema terapeutico delle leucemie acute. (*Biblioteca Hematologica*, XV, Favia Tipografia Viscontes, 1953, pp. 129-141.)
67. MAUPIN (B.), LOVERDO (A.), CHARY (R.), THEILLEUX (R.), STORCK (J.). — Marquage par le radiophosphore des leucocytes humains. Transfusion à l'homme et à l'animal ; résultats de 3 années d'expérience. (*Path. Gén. et Comp.*, 1955, 66, 450-461.)
68. MAUPIN (B.). — Au sujet de la séparation des leucocytes du sang humain : un phénomène de sédimentation paradoxale. (*Le Sang*, 1955, 26 [3], 328-332.)
69. MAUPIN (B.), CHARY (R.). — Présentation d'une nouvelle méthode de séparation des leucocytes et des plaquettes sanguines. (*Le Sang*, 1952, 23 [4], 336-340.)
70. MOLLISON (P.L.). — The survival of transfused leukocytes, in « Blood transfusion in clinical medicine ». (London, Blackwell ed., 1951, pp. 19-22.)
71. MORSE (W.I.). — Single self autograph of bone marrow and blood from rat using radioactive phosphorous. (*Amer. J. Med.*, 1950, 220, 522-529.)
72. NETOUSEK (M.). — Traitement de l'agranulocytose par le sang leucémique. (*Le Sang*, 1938, 12, 345-347.)
73. OSGOOD (E.E.), TIVEY (H.), DAVISON (K.H.), SEAMAN (A.J.) et LI (J.G.). — The relative rate of formation of new leukocytes in patients with acute and chronic leukemias, measured by the uptake of P^{32} in the isolated D.R.N.A. (*Cancer*, 1952, 5, 331-335.)
74. OSOGOE (B.). — Transplantation of hematopoietic tissues into the circulating blood. (*Anat. Rec.*, 1950, 107, 193-213.)
75. OSOGOE (B.) et AWAYA (K.). — Formation of lymphoid aggregations in the bone marrow of saponin poisoned rabbits following lymphocyte transfusion. (*Anat. Record*, 1956, 125, 121-129.)

76. OSUMI (K.). — Experimental studies on the intravenous injection of the homogenous leukocytes. (*Kyoto Faritsa Ikadaigaku Zassi*, 1942, 34, 719-722.)
77. SABIN (F.R.), CUNNINGHAM (R.S.), DOAN (C.A.) et KINDWALL (J.A.). — The normal rythm of the white blood cells. (*Bull. John Hopkins Hosp.*, 1925, 37, 1466.)
78. SEYDERHEIM (R.) et CESTREICH (C.). — Experim. Untersuchungen über den Verbleib absterbenden Leukocyten in Organismus. (*Ztschr. f. d. Exper. Med.*, 1927, 56 [3-4], 503-510.)
79. SIMMONS (B.S.) et EVERETT (N.B.). — Some aspects of radio-iron metabolism by leukocytes. (*Biochim. and Biophys. Acta*, 1954, 13, 102-110.)
80. STAUB (H.) et BUCHER (K.). — Ueber der Mechanismus der Leukopenie nach intravenös Glykogen zufuhr. (*Klin. Woch.*, 1938, 17, 1555.)
81. STRUMIA (M.M.). — The effect of leukocytic cream injections in the treatment of the neutropenias. (*Am. J. of Med. Sc.*, 1934, 187 [4], 545-552.)
82. STRUMIA (M.M.) et coll. — *Am. J. of Med. Sc.*, 1945, 209 [4], 436.
83. TUPPER (R.), WATTS (R.W.E.) et WORMALL (A.). — Studies on red and white blood cells labeled with Zn^{65} . (*Bioch. J.*, 1951, 48, pp. 37-38.)
84. TZANCK (A.), MAUPIN (B.), LEWI (S.) et ROBERT (M.P.). — Note technique sur la préparation de suspensions leucocytaires concentrées destinées à la transfusion. (*Bull. Mém. Soc. Méd. Hôp. Paris*, 1950, 66, 666-668.)
85. TZANCK (A.) et LEWI (S.). — Un cas d'agranulocytose sanguine. (*Bull. Mém. Soc. Méd. Hôp. Paris*, 1950, 66, 659-666.)
86. UNGAR (J.) et WILSON (G.R.), cité par LISSAC. — The fate of injected marked homologous leukocytes in the guineapig. (*Am. J. Pathology*, 1934, 10, 678.)
87. VALLEE (B.L.) et FLUHARTY (R.G.). — The metabolism studied means of radioactive isotope Zn^{65} . (*J. Clin. Inv.*, 1947, 26, 1199.)
88. VILLALOBOS (T.J.), ADELSON (E.) et BARILA (T.G.). — Hematologic changes in hypothermic dogs. (*Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1955, 89, 192-196.)
89. WEIDMAN (H.) et BUCHER (K.), cité par LISSAC. — *Helvet. Physiol. und Pharmacol. Acta*, 1951, 9, 87-83.
90. WEISBERGER (A.S.), GUYTON (R.A.), HEINLE (R.W.) et STORAASLI (J.P.). — The role of the lungs in the removal of transfused lymphocytes. (*Blood*, 1951, 6, 916-925.)
91. WEISBERGER (A.S.), HEINLE (R.W.), STORAASLI (J.P.) et HANNAH (R.). — Transfusion of leukocytes labeled with radioactive phosphorus. (*J. Clin. Inv.*, 1950, 29, 336-341.)

92. WEISBERGER (A.S.), HEINLE (R.W.) et HANNAH (R.). — Transfusion of leucocytes and products of disintegrated leukocytes. (*Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1949, 70, 749-753.)
 93. WEISBERGER (A.S.) et HEINLE (R.W.). — Mechanism responsible for the inability to transfuse leukocytes. (*Blood*, 1951, 6, 771.)
 94. WEISBERGER (A.S.) et LEVINE (S.). — Incorporation of radioactive l. cystine by normal and leukemic leukocytes in vivo. (*Blood*, 1954, 9, 1092.)
 95. WEISBERGER (A.S.), SUHRLAND (L.G.) et GRIGGS (R.C.). — Incorporation of radioactive l. cystine and l. methionine by leukemic leukocytes in vitro. (*Blood*, 1954, 9, 1095.)
 96. WEISBERGER (A.S.) et SUHRLAND (L.G.). — Comparative incorporation of S^{35} l. cystine and S^{35} sodium sulfate by normal and leukemic leukocytes. (*Blood*, 1955, 10 [5], 458-466.)
 97. WHITE (L.P.). — The intravascular life span of transfused leukocytes tagged with atabrine. (*Blood*, 1954, 9, 73-82.)
 98. WHITE (L.P.), BIERMAN (H.R.), KELLY (K.H.) et BYRON (L.R. Jr.). — The immediate hematologic effects of intravenous saccharated iron oxyde. (*Blood*, 1952, 7, 897-903.)
 99. WIENER (A.). — Blood groups and transfusion. (Springfield, Charles C. Thomas edit., 3^e édit., 1 vol., 1946, p. 86.)
 100. YOFFEY (J.M.). — Bone marrow. (*British Med. J.*, 1954, 4881, 193-197.)
 101. BERNARD (J.). — Action de l'or sur le sang. (*Revue de Phtisiologie*, 1934, XV, 741-779.)
 102. SCHNEIDER (W.C.). — Phosphorous compounds in animal tissues. I, Extraction and estimation of D.N.A. and R.N.A. (*J. Biol. Chem.*, 1945, 161, 293-303.)
 103. VILLALOBOS (T.J.), ADELSON (E.) et BARILA (T.G.). — Hematologic changes in hypothermic dogs. (*Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1955, 89, 192-196.)
-

TABLE DES MATIÈRES

CHAPITRE I. — Introduction et revue de la littérature	13
— <i>Notions actuelles sur la physiologie des leucocytes</i>	13
— <i>Revue de la littérature</i>	14
CHAPITRE II. — Techniques de marquage des leucocytes par les radio-isotopes	23
— <i>Historique et conditions générales du marquage</i>	23
— <i>Techniques utilisées au Centre de Transfusion et Réanimation de l'Armée</i>	27
— <i>Critique de ces techniques</i>	41
— <i>Causes d'erreur</i>	49
CHAPITRE III. — Résultats	55
— <i>Transfusion à l'homme de leucocytes marqués</i>	55
— <i>Injection à l'animal</i>	56
CHAPITRE IV. — Discussion. Applications cliniques et thérapeutiques	69
— <i>Discussion</i>	69
— <i>Applications cliniques et thérapeutiques</i>	74
CONCLUSIONS	75
BIBLIOGRAPHIE	79

